

DOSSIER 10º ANIVERSARIO BECAS

CARMEN DELGADO MIGUEL PÉREZ-MATEO

A LA INVESTIGACIÓN CONTRA EL CÁNCER DE PÁNCREAS



ASOCIACIÓN
CÁNCER
DE PÁNCREAS



AESPANC
Asociación Española
de Pancreatología



AEG
Asociación Española de Gastroenterología



Índice

01

Introducción

Carta conjunta de las tres Asociaciones AESPANC, AEG Y ACANPAN. - Pag. 3

02

Cáncer de páncreas

Datos del cáncer de páncreas. - Pag. 4

03

Objetivos y evolución

Objetivos Beca, Carrera de las Ciudades y evolución de la Beca. - Pag. 5

04

Memorias

Memorias de los proyectos ganadores de
la Beca Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo. - Pag. 7



1. Introducción

Unidos por la esperanza, comprometidos con el futuro de los enfermos de cáncer de páncreas.

Hace diez años decidimos unir nuestras fuerzas para cambiar la realidad del cáncer de páncreas. Lo hicimos desde dos asociaciones, la Asociación Cáncer de Páncreas (ACANPAN) y la Asociación Española de Pancreatología (AESPANC), a las que posteriormente se unió la Asociación Española de Gastroenterología (AEG), movidas por la urgencia de una enfermedad que no solo es devastadora por su diagnóstico, sino también por la falta de recursos y visibilidad que históricamente la han rodeado.

De esa unión nació la Beca Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo, un proyecto que hoy celebra su 10^a edición y que ha conseguido impulsar 18 proyectos de investigación por un total de **1.221.000 €**. Una cifra que refleja el compromiso de miles de personas que han apoyado nuestra causa: participando en la Carrera de las Ciudades contra el cáncer de páncreas, donando, investigando o acompañando a pacientes y familias.

Este dossier es, por un lado, una mirada atrás: a todo lo que hemos conseguido juntos, a los proyectos apoyados y a las personas que han puesto su talento y esfuerzo en avanzar en el conocimiento de esta enfermedad.

Pero, sobre todo, es una mirada hacia el futuro. Queremos que todo el conocimiento y experiencia generados en esta década se conviertan en una oportunidad para seguir avanzando. Por eso, con este trabajo buscamos también:

- **Acercar la investigación a los pacientes**, que puedan comprender mejor hacia dónde vamos, qué se está investigando y qué horizonte se vislumbra.
- **Fortalecer la comunidad científica en cáncer de páncreas**, conectando a los investigadores que han formado parte de la Beca a lo largo de estos años.
- **Fomentar el diálogo, la colaboración y las sinergias** entre ellos, convencidos de que la cooperación es clave para lograr avances reales.

Desde nuestras asociaciones, seguimos trabajando con esperanza, con ambición y con un objetivo común: **que los pacientes vivan más y vivan mejor**.

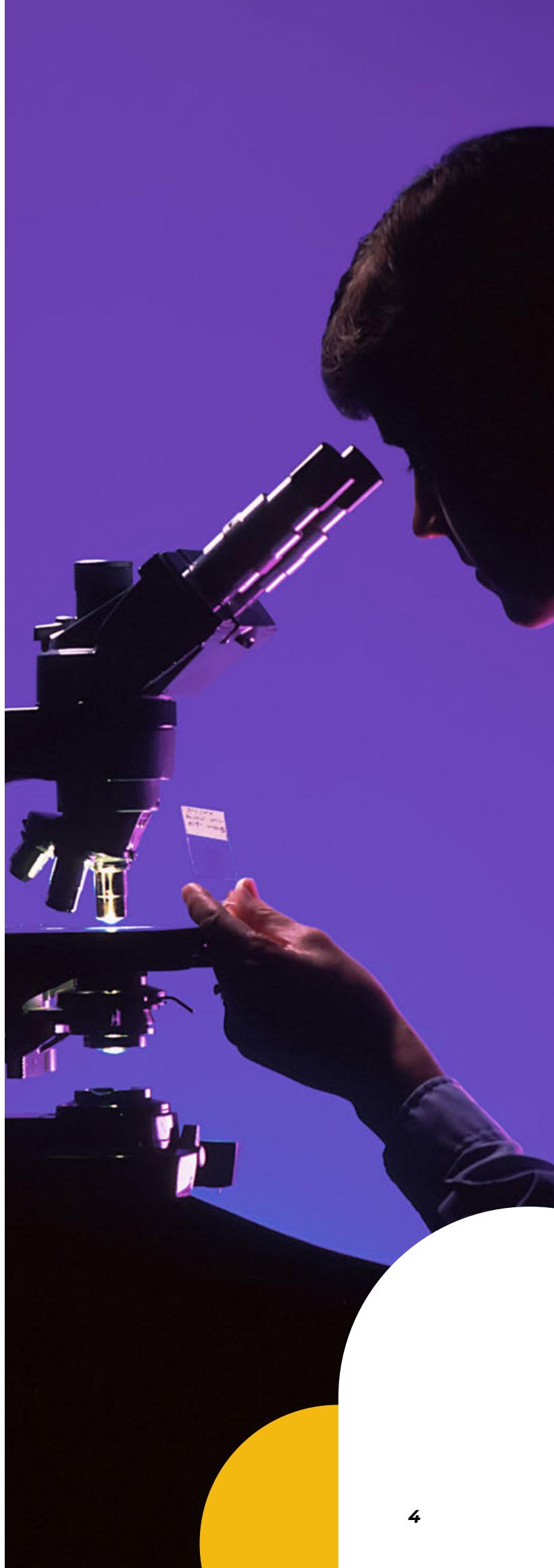
2. Cáncer de páncreas: algunos datos

El cáncer de páncreas representa uno de los desafíos médicos más urgentes y complejos de nuestro tiempo. Su diagnóstico suele llegar tarde, sus síntomas son inespecíficos, los tratamientos actuales resultan limitados y su impacto en la vida de los pacientes y sus familias es devastador. Pese a ello, sigue siendo una de las enfermedades oncológicas más desconocidas para la sociedad y menos visibles en la agenda pública.

Estos son algunos datos que reflejan la magnitud de este reto:

- En 2025 se estima que **10.338 personas serán diagnosticadas de cáncer de páncreas en España**. Cuando comenzamos este camino en 2014, esa cifra era de **6.400** personas.
- **Es el 8º cáncer en incidencia y la 3ª causa de muerte por cáncer** en nuestro país.
- Cerca del **80% de los pacientes se diagnostican en fases avanzadas**, lo que provoca que solo **2 de cada 10 pacientes puedan someterse a cirugía**, que es la única posibilidad real de curación.
- **La tasa de supervivencia a los 5 años es de apenas el 8,6%**, y un 75% no supera el primer año tras el diagnóstico.
- En los últimos 40 años, los avances terapéuticos han sido muy limitados, mientras que su **incidencia ha aumentado un 160%** en tres décadas.

Estos datos son mucho más que cifras: son realidades humanas que apelan a nuestra responsabilidad colectiva. El cáncer de páncreas no puede esperar. **Solo la investigación puede cambiar esta realidad.**



3. Objetivos y Evolución

Becas Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo

Nacieron en 2015 con una misión:

Generar esperanza a través de la investigación en cáncer de páncreas.

Desde su origen,
estas becas persiguen:

- Estimular el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas.
- Fomentar la investigación de calidad en España.
- Atraer y retener talento científico.
- Generar impacto real y tangible en los pacientes y su entorno.
- Establecer puentes entre la comunidad científica y las personas afectadas.

Estas becas suponen mucho más que una ayuda económica: son un motor de esperanza, una declaración de intenciones y una vía concreta para cambiar el futuro del cáncer de páncreas.

Durante estos diez años:

- Hemos destinado **1.221.000 €** a la investigación en cáncer de páncreas.
- Se han financiado **18 proyectos** liderados por equipos punteros de todo el país.
- Estas becas son posibles gracias a la recaudación generada por la **Carrera de las Ciudades**, un evento solidario que une deporte, sociedad y ciencia.

Carrera de las Ciudades
contra el cáncer de páncreas:

La financiación de estas becas ha sido posible gracias al esfuerzo colectivo y comprometido de miles de personas que participan cada año en la **Carrera de las Ciudades contra el Cáncer de Páncreas**.

Desde su primera edición en 2015, esta iniciativa ha crecido hasta convertirse en el **mayor evento solidario en Europa en apoyo a la investigación en cáncer de páncreas**.

Evolución de la Carrera de las Ciudades:

- **Ciudades participantes:** Desde sus inicios la Carrera de las Ciudades contra el cáncer de páncreas se ha celebrado en 12 ciudades españolas e italianas.
- **Participantes acumulados:** Más de 73.106 participantes y 424.463 km recorridos en todas las ediciones.
- **Fondos recaudados hasta la fecha:** **1.211.114 €** destinados íntegramente a la financiación de proyectos de investigación en cáncer de páncreas.

Cada dorsal, cada zancada, cada línea de meta cruzada representa un paso más hacia un futuro con más esperanza.

Evolución de las Becas:

A lo largo de sus diez ediciones, la Beca Carmen Delgado / Miguel Pérez-Mateo ha financiado **18 proyectos de investigación** de excelencia en centros punteros de todo el país. Proyectos que han abordado áreas clave como:

- Diagnóstico precoz
- Nuevas dianas terapéuticas
- Inmunoterapia
- Caracterización molecular del tumor
- Biomarcadores de respuesta
- Biopsia líquida, entre otros

Esta trayectoria ha permitido consolidar una red de investigadores e investigadoras comprometidos con el cambio, muchos de los cuales han continuado desarrollando líneas de trabajo estables en el ámbito del cáncer de páncreas.

En estos 10 años, hemos aprendido que **cada proyecto cuenta**, que **cada paso suma** y que **la investigación es el camino más directo hacia la esperanza**.



Memorias de los proyectos ganadores de la Beca Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo.

Índice de memorias

2016 Beca Básica. **Pilar Navarro.** Título: Galectina-1: una nueva diana para el desarrollo de herramientas diagnósticas y terapéuticas para el cáncer de páncreas - Pag. 10

2017 Beca Básica. **Bruno Sainz Anding.** Título: Identificación de receptores de escape inmunológico de las células madre del cáncer de páncreas - Pag. 17

2018 Beca Básica. **Carmen Guerra.** Título: Análisis de la metilación del ADN en biopsia líquida para la monitorización y manejo de pacientes con cáncer de páncreas - Pag. 32

2018 Beca Cínica. **Nuria Malats.** Título: Marcadores microbianos para el diagnóstico del adenocarcinoma ductal de páncreas - Pag. 38

2019 Beca Básica. **Eva Vaquero.** Título: Intervención farmacológica sobre el patrón fibroinflamatorio asociado al desarrollo de cáncer de páncreas - Pag. 47

2019 Beca Clínica. **Alfredo Carrato.** Título: Programa de aproximación a la detección precoz del cáncer de páncreas exocrino en población general de mayor riesgo, definida por criterios clínico-epidemiológicos, mediante nuevos biomarcadores en biopsia líquida y técnicas de imagen - Pag. 57

2020 Beca Básica. **Javier Martínez-Useros.** Título: Exosomas para mejorar la efectividad y reducir la toxicidad de los tratamientos contra el cáncer de páncreas - Pag. 70

2020 Beca Clínica. **Rocío I. Rodríguez Macías.** Título: Búsqueda de biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y la predicción de respuesta al tratamiento farmacológico del cáncer de páncreas - Pag. 93

2021 Beca Básica. **Carmen Guerra.** Título: Nueva estrategia terapéutica: estroma e inmunoterapia - Pag. 104

Índice de memorias

2021 Beca Clínica. **Octavio Caba Pérez** Título: Diagnóstico precoz del adenocarcinoma de páncreas mediante la detección de IRAK3 y CLEC4D en biopsia líquida - Pag. 109

2022 Beca Básica. **Alejandro Ibáñez-Costa y Justo P. Castaño**
Título: Neoantígenos derivados del splicing como dianas de la inmunoterapia en cáncer de páncreas (SplicInmuno) - Pag. 121

2022 Beca Clínica. **Óscar Pozo y Gabriel Gil.** Título: Validación de la firma metabolómica CarboSign para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas - Pag. 132

2023 Beca Básica. **Diana Rafael y Joaquín Seras-Franzoso.**
Título: Nanoclustered Affimers for Targeted KRAS Ablation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma - Pag. 148

2023 Beca Clínica. **Pilar Navarro.** Título: Validación de la detección de sAXL en plasma para diagnóstico precoz del cáncer de páncreas - Pag. 162

2024 Beca Básica. **Carmen Guerra.** Título: Mecanismos moleculares y estrategias para la prevención y diagnóstico temprano del cáncer de páncreas - Pag. 169

2024 Beca Clínica. **María Victoria García Ortiz.** Título: Análisis de la metilación del ADN en biopsia líquida para la monitorización y manejo de pacientes con cáncer de páncreas - Pag. 178

2025 Beca Básica. **José Yélamos López.** Título: Aprovechando las funciones inmunomoduladoras de PARP-2 para combatir el cáncer de páncreas - Pag. 186

2025 Beca Clínica. **Leticia Moreira Ruiz.** Título: PREVENPANC. Estudio Multicéntrico Español para la Prevención del Cáncer de Páncreas - Pag. 194

Beca 2016

Pilar Navarro Medrano:

Pilar Navarro es licenciada y doctora en Farmacia. Su carrera investigadora se ha centrado en entender los mecanismos que causan enfermedades humanas, especialmente el cáncer.

Comenzó estudiando el cáncer de piel durante su tesis doctoral y, tras una etapa postdoctoral en Milán centrada en la formación de vasos sanguíneos en tumores, se incorporó en 1999 a Barcelona para investigar el cáncer de páncreas.

Actualmente dirige el grupo "Dianas Moleculares del Cáncer" en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC) y el Instituto de Investigación del Hospital del Mar, con el objetivo de encontrar nuevas herramientas para diagnosticar y tratar mejor este tipo de cáncer.



TITULO:

Galectina-1: una nueva diana para el desarrollo de herramientas diagnósticas y terapéuticas para el cáncer de páncreas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Pilar Navarro

Equipo investigador: José Yélamos, Neus Martínez-Bosch, Luis Barranco, Mar Iglesia, Francisca Mulero, Jorge Martínez, Miguel Ángel Morcillo, Mireia Moreno, Marta Oteo, Eduardo Romero

¿Por qué estudiar el cáncer de páncreas?

El cáncer de páncreas es uno de los tumores más agresivos y de peor pronóstico. El adenocarcinoma ductal pancreático (abreviado PDAC, por sus siglas en inglés) es el tipo más común (más del 90%). Esta enfermedad suele avanzar en silencio, sin causar síntomas claros hasta que ya está en una fase avanzada. Cuando por fin se diagnostica, muchas veces ya no es posible operar, y los tratamientos disponibles son poco eficientes. De hecho, a pesar de los avances en investigación en otros tipos de tumores, el cáncer de páncreas sigue teniendo una supervivencia media muy baja, de unos 4 a 6 meses, y solo el 13% de los pacientes sobrevive más de 5 años.

Los tratamientos actuales incluyen principalmente quimioterapia con gemcitabina o FOLFIRINOX, pero sus efectos en frenar el avance del tumor son modestos. Los nuevos tratamientos con fármacos diana-dirigidos o inmunoterapia, que han supuesto una revolución para otros cánceres, no han conseguido hasta ahora tener éxito en PDAC. Tampoco existen métodos eficaces para detectarlo de forma precoz, ya que los análisis de sangre y las pruebas de imagen no siempre lo identifican, y la biopsia sigue siendo la única forma definitiva de diagnóstico.

Por todo esto, encontrar nuevas formas de diagnosticar y tratar este tipo de cáncer es urgente y prioritario.

El tumor y su entorno: un aliado del cáncer

Una de las características que más llama la atención en el cáncer de páncreas es el entorno que rodea al tumor, conocido como **estroma tumoral**. Este estroma no es algo pasivo: está formado por una densa red de fibras, células inmunes, vasos sanguíneos y fibroblastos (células que normalmente ayudan a reparar tejidos), que en este caso favorecen el crecimiento del tumor en lugar de frenarlo. En el caso del PDAC el estroma puede llegar a ser más del 80% de la masa tumoral, lo que refleja la gran importancia que tiene en su agresividad.

En los últimos años, se ha visto que este estroma tiene un papel clave: no solo alimenta el tumor, sino que también lo protege frente a los medicamentos y bloquea la acción del sistema inmune, impidiendo que las defensas del cuerpo ataquen a las células cancerosas. Por eso, en lugar de centrarnos solo en matar las células del tumor, hay que buscar también formas de atacar ese entorno protector.

¿Qué es la Galectina-1 y por qué nos interesa?

En este contexto aparece una proteína muy especial: la **Galectina-1** (abreviada como **Gal-1**). Esta molécula pertenece a una familia de proteínas que se unen a azúcares en la superficie de las células y regulan muchas funciones, como el crecimiento celular, la formación de vasos sanguíneos, la respuesta del sistema inmune y, lo que más nos interesa, el desarrollo del cáncer.

Se ha observado que Gal-1 está muy aumentada en muchos tipos de tumores, incluido el cáncer de páncreas. En este último, Gal-1 se encuentra sobre todo en el estroma tumoral, y los niveles altos de esta proteína se asocian con una peor evolución del paciente. En otras palabras, cuanto más Gal-1 hay, más agresivo es el tumor.

Estudios anteriores de nuestro grupo demostraron que, al eliminar Gal-1 en modelos animales de cáncer de páncreas, se conseguía frenar el crecimiento del tumor y reducir la formación de vasos sanguíneos y la activación del estroma. Además, se observó algo muy interesante: el sistema inmune se reactivaba, lo cual es especialmente importante en un tumor como el de páncreas, que suele ser muy "invisible" para las defensas del cuerpo.

Asimismo, otra característica de la proteína Gal-1 es que se libera al espacio fuera de la célula y se puede medir sus niveles en sangre. Por tanto, como los niveles de Gal-1 son muy altos en PDAC, nos planteamos medir sus niveles en sangre y compararlos con individuos sanos para explorar si la detección de Gal-1 podría ser útil como biomarcador de la enfermedad.

¿Qué nos propusimos en este proyecto?

El objetivo principal de nuestro proyecto fue estudiar a fondo el papel de Gal-1 en el cáncer de páncreas y explorar si podía ser útil para mejorar el tratamiento y/o el diagnóstico del PDAC.

En concreto, decidimos estudiar:

Objetivo 1: Analizar si el **bloqueo de Gal-1** podría convertirse en un **nuevo tratamiento para pacientes con PDAC**. Es decir, si sería útil para:

- Mejorar la supervivencia.
- Reducir la agresividad del tumor.
- Disminuir la aparición de metástasis (la propagación del cáncer a otros órganos).
- Recuperar la respuesta del sistema inmunitario frente al tumor.

Además, quisimos dar un paso más: pasar de los modelos genéticos (ratones a los que se les "quita" Gal-1) a desarrollar medicamentos o anticuerpos capaces de bloquear esta proteína, pensando en un futuro uso en pacientes.

Objetivo 2: Explorar si medir los niveles de Gal-1 en sangre de pacientes con PDAC podía servir para **diagnosticar** la enfermedad, o **para predecir su evolución**.

¿Qué métodos utilizamos?

1. Para estudiar si bloquear Gal-1 podía tener utilidad para el tratamiento de PDAC, usamos un modelo de ratón que desarrolla de forma natural un tipo de cáncer de páncreas muy similar al humano. Estos ratones tienen una mutación en un gen llamado KRas, muy común en pacientes con este tumor, y también una alteración en el gen p53, que ayuda a controlar el crecimiento celular.

Comparamos dos grupos de ratones con este modelo con distintas cantidades de Gal-1: ratones normales (con Gal-1) y ratones completamente deficientes en Gal-1.

Observamos su evolución de dos formas:

- Dejamos que los tumores crecieran hasta que llegaran a un tamaño éticamente permitido y medimos la supervivencia.
- Sacrificamos otros ratones a los 4 meses para estudiar el desarrollo del tumor en fases tempranas.

También analizamos cómo se comportaban las células del sistema inmune en estos tumores mediante técnicas de laboratorio avanzadas.

2. Para estudiar si Gal-1 podía tener utilidad para el **diagnóstico** de PDAC, utilizamos muestras de sangre de tres grupos de personas:

- Individuos control (personas sanas)
- Pacientes con PDAC
- Pacientes con pancreatitis crónica

Este último grupo fue incluido porque la pancreatitis crónica tiene síntomas muy parecidos al PDAC y el diagnóstico diferencial de estas dos enfermedades es un problema clínico, por lo que encontrar biomarcadores específicos para cada una de ellas puede ser muy útil para un buen diagnóstico de PDAC.

Y utilizamos una sencilla técnica que se usa de rutina en laboratorios de diagnóstico llamada ELISA (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), que es además de bajo coste para el sistema sanitario.

¿Qué descubrimos?

1. Bloquear Galectina-1 puede servir para tratar el cáncer de páncreas

Nuestros resultados fueron muy prometedores. En primer lugar, la inhibición de Gal-1 en ratones conseguía:

- **Mayor supervivencia:** los ratones sin Gal-1 vivieron significativamente más que los que sí la tenían.
- **Tumores menos agresivos:** vimos que, sin Gal-1, los tumores crecían más lentamente y las lesiones aparecían más tarde (Fig.1).
- **Reducción de las metástasis:** las metástasis al hígado se reducían notablemente (Fig.2).

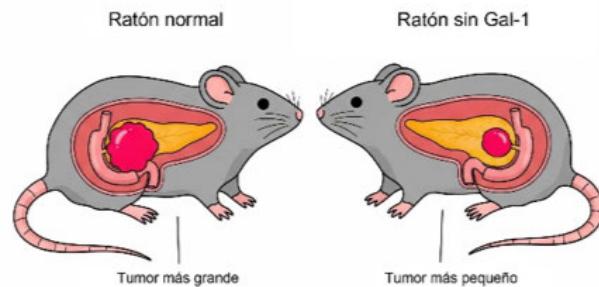


Figura 1. Gal-1 y el crecimiento tumoral

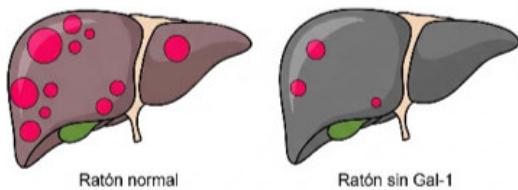


Figura 2. Gal-1 y metástasis

- **Activación del sistema inmune:** en los tumores de los ratones sin Gal-1 encontramos más linfocitos T, que son las células que atacan el cáncer, y menos células inmunosupresoras, que suelen proteger al tumor. Es decir, el sistema inmune volvía a activarse (Fig.3).

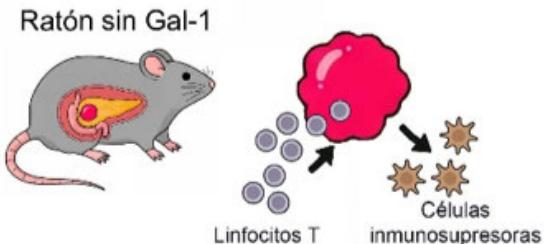


Figura 3. Gal-1 y el sistema inmune

Estos datos indican que Gal-1 juega un papel central en ayudar al tumor a crecer, protegerse del tratamiento y escapar del sistema inmune. Por tanto, su inhibición es una estrategia muy atractiva para nuevas terapias.

¿Y si bloqueamos Gal-1 con un fármaco?

Hasta ahora habíamos trabajado con ratones modificados genéticamente, pero queríamos ir más allá y buscar una forma de bloquear Gal-1 con medicamentos, como se haría en pacientes.

Para ello colaboramos con una empresa que ya había desarrollado unos anticuerpos capaces de unirse a Gal-1 y bloquear su función. Probamos estos anticuerpos en laboratorio y tres de ellos fueron eficaces para impedir que Gal-1 provocara la muerte de las células inmunes antitumorales. Lamentablemente, estos experimentos no pudieron continuar porque la empresa fue adquirida por otra multinacional y finalizaron la colaboración. Actualmente esta parte del proyecto sigue en curso, a través de otras colaboraciones donde estamos

probando nuevos fármacos, tanto otros nuevos anticuerpos bloqueantes como otro tipo de fármacos inhibidores químicos.

2. Galectina-1 puede servir para diagnosticar el cáncer de páncreas

Uno de los grandes retos del cáncer de páncreas es la falta de marcadores en sangre que permitan detectarlo en fases tempranas o saber si el tratamiento está funcionando. El único marcador usado actualmente en la práctica clínica es una proteína llamada CA19-9, pero no es fiable en todos los pacientes: en algunos no se eleva, aunque tengan PDAC, y en otros pacientes puede estar alta por causas no relacionadas con el cáncer.

Por eso, parte de nuestro estudio se centró en investigar si Galectina-1 también puede ser útil como biomarcador en sangre, es decir, igual que se mide glucosa en sangre para diagnosticar diabetes, medir Gal-1 como una señal que nos ayude a diagnosticar el cáncer de páncreas o predecir la evolución de la enfermedad.

Nuestro estudio demostró que los niveles de Galectina-1 en sangre:

- Reflejan fielmente la cantidad de Galectina-1 presente en el tumor.
- Los pacientes con cáncer de páncreas tenían niveles de Gal-1 en sangre mucho más elevados que los controles sanos. Este aumento de Gal-1 se detectaba incluso en fases tempranas del tumor, lo que sugiere que podría servir como **herramienta de diagnóstico precoz** (Fig.4).
- La combinación de Gal-1 y CA19-9 mejora mucho la precisión del diagnóstico: reduce los casos no detectados (falsos negativos) y mejora la capacidad para diferenciar entre cáncer y pancreatitis, algo que suele ser difícil con las pruebas habituales.

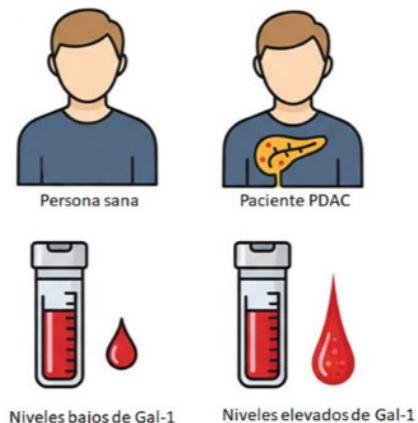


Figura 4. Gal-1 como biomarcador

¿Sirve también para predecir el pronóstico?

Sí: observamos que los pacientes con niveles más altos de Galectina-1 en sangre tenían peor evolución clínica. Esto abre la posibilidad de usar Gal-1 como marcador pronóstico, para ayudar a predecir cómo evolucionará la enfermedad.

En resumen, nuestros datos apoyan que **Gal-1 puede tener un valor clínico como marcador en sangre**, tanto para detectar el cáncer como para evaluar su progresión.

Conclusión: Galectina-1, una pieza clave en el cáncer de páncreas

Nuestros hallazgos indican que Galectina-1 juega un importante papel en el cáncer de páncreas: participa en el desarrollo del tumor, favorece su crecimiento, contribuye a que forme metástasis y bloquea la respuesta del sistema inmunitario.

Al eliminar Gal-1 o bloquearla, el tumor se vuelve menos agresivo y el sistema inmune puede volver a actuar, algo fundamental para que funcione la inmunoterapia, una de las grandes esperanzas actuales en la lucha contra el cáncer. Por eso, proponemos que Gal-1 sea considerada una nueva diana terapéutica y un nuevo "punto de control inmunológico", como lo son actualmente los famosos PD-1 o CTLA-4 en otros tumores como el melanoma. Esto abre la puerta a desarrollar tratamientos innovadores para pacientes con cáncer de páncreas, que actualmente tienen muy pocas opciones.

Asimismo, nuestros estudios demuestran que Gal-1 no solo es importante como posible diana terapéutica, sino que también puede tener utilidad como marcador en sangre para diagnosticar el cáncer o para evaluar su progresión o incluso la respuesta a los tratamientos. Aunque todavía es necesario validar estos resultados en estudios con más pacientes, creemos que Gal-1 podría formar parte de un futuro panel de biomarcadores que ayuden a los médicos a tomar decisiones más informadas y personalizadas en el manejo del cáncer de páncreas. De hecho, estos resultados han sentado la base para nuestro proyecto posterior sobre el uso de un nuevo biomarcador (AXL) para la detección temprana de PDAC, ganador de la Beca Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo, 8^a edición, modalidad clínica (Validación de la detección de sAXL en plasma para diagnóstico precoz del cáncer de páncreas).

Este proyecto ha sido posible gracias al apoyo de la asociación de pacientes, que ha permitido financiar una línea de investigación innovadora y arriesgada, pero con importante potencial traslacional. También queremos agradecer a todos los pacientes y familias que, con su apoyo y confianza, hacen posible que la ciencia avance cada día. Gracias a vosotros, hemos dado un paso más en la lucha contra uno de los cánceres más duros. Seguimos trabajando para transformar estos descubrimientos en tratamientos reales que puedan mejorar la vida de los pacientes.

Glosario de términos

- **PDAC:** Adenocarcinoma ductal pancreático (el tipo más común de cáncer de páncreas)
- **Gal-1:** Galectina-1, una proteína que se encuentra en altos niveles en los tumores PDAC y que tiene funciones pro-tumorales.
- **ELISA:** Técnica de laboratorio para medir proteínas en sangre

Publicaciones derivadas de esta investigación:

- 1) Martinez-Bosch N, Barranco LE, Orozco CA, Moreno M, Visa L, Iglesias M, Oldfield L, Neoptolemos JP, Greenhalf W, Earl J, Carrato A, Costello E, Navarro P. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. **Oncotarget.** 2018; 9(68):32984-32996.
- 2) Orozco CA, Martinez-Bosch N, Guerrero PE, Vinaixa J, Dalotto-Moreno T, Iglesias M, Moreno M, Djurec M, Poirier F, Gabius HJ, Fernandez-Zapico ME, Hwang RF, Guerra C, Rabinovich GA, Navarro P. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor-stroma crosstalk. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2018;115(16):E3769-E3778.
- 3) Martinez-Bosch N, Vinaixa J, Navarro P. Immune Evasion in Pancreatic Cancer: From Mechanisms to Therapy. **Cancers (Basel).** 2018;10(1).



Beca 2017

Bruno Sainz Anding:

Doctorado en Microbiología e Inmunología en la Universidad de Tulane, EEUU, en 2015. El Dr. Sainz es actualmente Investigador Científico en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM) Sols-Morreale, centro mixto CSIC-UAM y co-coordinador de Área 3 Cáncer del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Los logros y la investigación del laboratorio del Dr. Sainz han dado lugar a más de 100 publicaciones, varias subvenciones concedidas en Estados Unidos (Cancer Research Institute, Concern Foundation), España (ISCI, AECC, ACANPAN, Beca FERO) y Europa (EURO-NanoMed, TRANSCAN3, EIC Transition), solicitudes de patentes, numerosas charlas y e invitaciones a presentaciones, afiliaciones editoriales y reconocimiento internacional. El Dr. Sainz tiene una amplia experiencia en inmunología, virología y oncología, con experiencia específica en cáncer de páncreas, células madre de cáncer, modelos de cáncer en animales pequeños y descubrimiento de fármacos.

TITULO:

Identificación de receptores de escape inmunológico de las células madre del cáncer de páncreas.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Bruno Sainz Anding

Introducción al cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas es una enfermedad en la que las células del páncreas comienzan a crecer de manera descontrolada y forman un tumor que puede extenderse a otros órganos. Este tipo de cáncer suele detectarse en etapas avanzadas, porque en sus fases iniciales apenas causa síntomas claros. Por esta razón, el pronóstico suele ser desfavorable y las tasas de supervivencia a cinco años son bajas. Además, las opciones de tratamiento (cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia) no siempre funcionan de manera eficiente. Por eso, investigar nuevas formas de atacar este tumor es fundamental: entre las áreas de estudio más prometedoras están las células madre del cáncer (CSC en inglés), un pequeño subgrupo de células dentro del tumor que parecen resistir mejor los tratamientos convencionales y contribuir a que el cáncer vuelva a crecer o se extienda.

1. Resumen del proyecto (Resumen original)

En los últimos años, la inmunoterapia (tratar de estimular el propio sistema de defensa del cuerpo para que ataque al tumor) se ha convertido en una estrategia muy prometedora contra muchos tipos de cáncer. Sin embargo, en el caso del adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC, por sus siglas en inglés), la inmunoterapia todavía no resulta efectiva en la mayoría de los pacientes.

Este tipo de cáncer es muy agresivo y a menudo ya ha formado metástasis (lesiones en otros órganos) cuando se diagnostica. Otra razón de su gravedad es que dentro del tumor existe un pequeño grupo de células capaces de resistir tratamientos, reproducirse sin control y regenerar el tumor: son las llamadas células madre del cáncer (CSC, del inglés "Cancer Stem Cells"). Mientras queden estas células, es muy difícil erradicar por completo el tumor.

Gracias a ratones creados genéticamente para desarrollar este cáncer de páncreas (modelos "KPC"), hemos logrado aislar estas células madre tumorales y estudiar qué proteínas las hacen tan especiales. Algunos de nuestros estudios iniciales mostraron que estas CSCs expresan con fuerza una proteína llamada Peptidoglycan Recognition Protein 1 (Pglyrp1), que normalmente ayuda a defender el cuerpo de bacterias. Lo interesante es que Pglyrp1 parece proteger estas células de ser destruidas por los linfocitos T, un tipo de célula inmunitaria clave para eliminar células tumorales. Cuando "silenciamos" Pglyrp1 en las CSCs (es decir, evitamos que fabriquen esa proteína), las células se vuelven más susceptibles a que el sistema inmune las destruya.

Por tanto, en este proyecto nos propusimos:

1. **Estudiar en detalle el papel de Pglyrp1** en la manera en que las CSCs del páncreas escapan al ataque de los linfocitos T, usando técnicas para aumentar o reducir su presencia.
2. **Descubrir el mecanismo molecular** por el cual Pglyrp1 protege a las CSCs (por ejemplo, si interactúa con otras proteínas que modulan la muerte celular).
3. **Diseñar anticuerpos** contra Pglyrp1 (similares a los anticuerpos que hoy se usan clínicamente contra otros "receptores de escape" como PD-L1) y probar si al bloquear Pglyrp1 se consigue frenar el crecimiento tumoral y las metástasis en ratones.

2. Resultados principales y hallazgos

A lo largo de los tres años de trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones más relevantes:

2.1. El microambiente y las células tumorales en el cáncer de páncreas crean un entorno "frío" para el sistema inmune

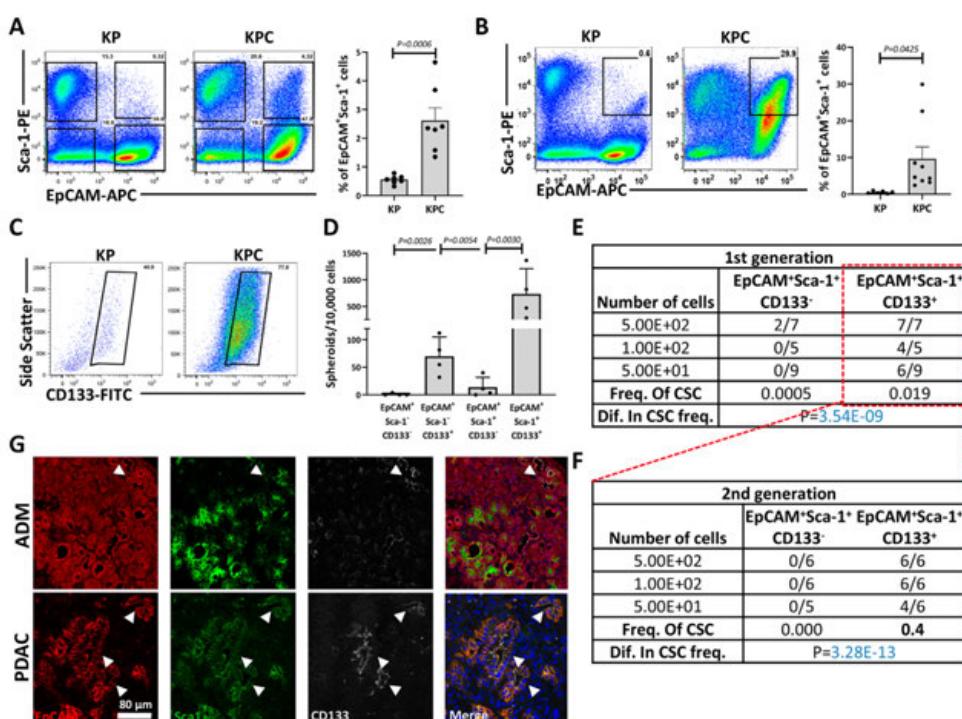
- Se sabe que el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) tiene una capacidad especial de "engaños" al sistema inmunitario, generando un entorno inflamatorio muy supresor.
- En estos tumores, las células inmunitarias que se infiltran suelen ser células T reguladoras (Tregs) y células mieloídes supresoras (MDSCs), que reducen la acción de las células T "efectoras" (aquellas que matarían las células cancerosas). Además, los linfocitos T CD8+ (que deberían destruir las células tumorales) aparecen poco activos.
- Se evaluaron varios mecanismos que podrían explicar esta inmunosupresión intrínseca de las células tumorales, como la sobreexpresión de PD-L1. Sin embargo, en nuestros modelos de cáncer de páncreas ninguna de esas vías fue la responsable principal de la capacidad del tumor para escapar al ataque inmunitario.

2.2. Aislamiento de las CSCs en modelos de ratón inmunocompetentes

- En estudios previos con CSCs de pacientes humanos, las células se probaban en ratones inmunodeprimidos (al no poder usar ratones normales porque el sistema inmune "mataría" las células humanas). Esto limita el estudio de la interacción inmunológica.
- Con los ratones KPC (en los que, por ingeniería genética, desarrollan tumores de páncreas muy parecidos a los humanos), pudimos aislar un subgrupo de células que expresan simultáneamente tres marcadores de superficie: EPCAM+, SCA1+ y CD133+.
- Estas células triple positivas demostraron poseer propiedades de CSCs cuando se trasplantaron en ratones: formaban tumores de forma muy eficiente, confirmando que eran las células responsables del crecimiento y mantenimiento del cáncer.

Figura 1 (siguiente página): **(A)** Panel izquierdo: diagrama representativo de citometría de flujo que muestra células pancreáticas **Lin-** teñidas con **EpCAM** y **Sca-1** procedentes de ratones control de 8 semanas **LSL-Kras^{^G12D/+}; LSL-Trp53^{^R172H/+}** (KP) frente a ratones **LSL-Kras^{^G12D/+}; LSL-Trp53^{^R172H/+}; Pdx-1-Cre** (KPC). Panel derecho: histograma que muestra el porcentaje medio \pm SEM de células **EpCAM+Sca-1+** en animales KP y KPC ($n=6$, valores de p determinados mediante prueba t no apareada). **(B)** Panel izquierdo: diagrama representativo de citometría de flujo que muestra la expresión de **EpCAM** y **Sca-1** en células **Lin-** de un tumor de ratón KPC a las 16 semanas y los correspondientes páncreas de un ratón control KP. Panel derecho: histograma que muestra el porcentaje medio \pm SEM de células **EpCAM+Sca-1+** en grupos KP y KPC ($n=6$, valores de p determinados mediante prueba t no apareada). **(C)** Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra la expresión de **CD133** dentro del subconjunto **EpCAM+Sca-1+** en ratones KP y KPC a las 16 semanas. **(D)** Media \pm SEM del número de esferoides generados por cada 10 000 células de las poblaciones indicadas tras 10 días en condiciones de cultivo para esferas. Las células se aislaron del páncreas de ratones KPC de 16 semanas ($n=4$, valores de p determinados mediante ANOVA de un factor, con prueba de Dunnett).

(E) Panel que detalla el potencial tumorígeno (número de tumores formados/número de inyecciones) del número indicado de células **EpCAM+Sca-1+** inyectadas en los flancos de ratones desnudos atípicos. Las células fueron aisladas de tumores KPC y clasificadas según la expresión de **CD133**. Se muestra la frecuencia predicha (freq.) de CSC en función de las diluciones evaluadas (valores de p determinados mediante análisis χ^2 utilizando el software ELDA). **(F)** Panel que detalla el potencial de injerto secundario de células tumorales **EpCAM+Sca-1+CD133+** y **EpCAM+Sca-1+CD133-** aisladas de tumores parentales generados en (E). Se muestran las frecuencias de CSC predichas (freq.) en función de las diluciones evaluadas (número de inyecciones >5 , valores de p determinados mediante análisis χ^2 con el software ELDA). **(G)** Imágenes representativas de microscopía confocal con triple tinción mediante anticuerpos contra **EpCAM** (rojo), **Sca-1** (verde), **CD133** (gris) y **DAPI** (marcador nuclear, azul). Panel superior: páncreas de un ratón KPC de 8 semanas en el que se observa metaplasia acino-ductal (ADM). Panel inferior: tumor (PDAC) de un ratón KPC de 16 semanas. Las puntas de flecha indican la población triple positiva. Escala = 80 μ m.

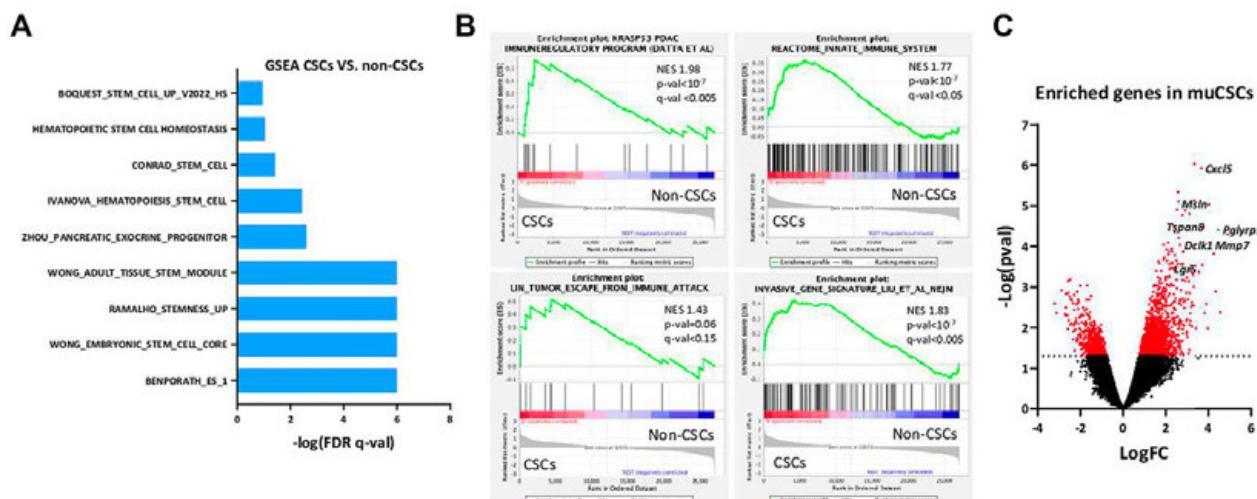


2.3. Búsqueda de genes que explicaran el “blindaje” de las CSCs frente a células T

- Comparamos el conjunto de genes expresados (transcriptoma) en las CSCs (EPCAM+S CA1+CD133+) frente a las células tumorales no CSCs.
- Se realizaron análisis de enriquecimiento de rutas (“Gene Set Enrichment Analysis”) y se encontró que, además de las firmas genéticas típicas de células madre, las CSCs presentan un perfil elevado de genes asociados a la respuesta inmunitaria innata y a mecanismos de escape inmunológico.
- Entre los genes destacados con posible función de “protección” inmunológica, identificamos especialmente PGLYRP1 (también llamado TAG7), que estaba muy sobreexpresado en las CSCs comparado con el resto de las células tumorales.

Figura 2 (siguiente página): **Análisis transcriptómico de CSCs triple-positivos y validación de PGLYRP1 como marcador de CSC.**

(A) Conjuntos génicos enriquecidos en el perfil transcriptómico de la población EpCAM+Sca-1+CD133+ (CSCs) en comparación con el resto de las poblaciones (no-CSC), mostrando un enriquecimiento en firmas génicas de células madre. Se muestran los valores $-\log(\text{valor q FDR})$ para cada vía utilizando las firmas génicas publicadas indicadas, con un valor nominal de $p<0,05$ y $\text{FDR} < 15\%$ ($n=3$ réplicas biológicas). **(B)** Gráficas GSEA que muestran el enriquecimiento de las firmas indicadas en la población EpCAM+Sca-1+CD133+ (CSC) frente al resto de células tumorales (no-CSC). **(C)** Gráfico tipo volcana que muestra los genes significativamente enriquecidos (en rojo) en las CSCs EpCAM+Sca-1+CD133+ frente al resto de las células tumorales ($n=3$ réplicas biológicas).



2.4. ¿Qué es PGLYRP1 y por qué llama la atención en el cáncer de páncreas?

- PGLYRP1 (Peptidoglycan Recognition Protein 1) es, en condiciones normales, una proteína asociada al sistema inmune innato y a la defensa contra bacterias, especialmente en el intestino.
- En algunos estudios se había visto que PGLYRP1 puede intervenir en procesos de apoptosis (muerte celular) en cultivos de laboratorio, pero jamás se había analizado su papel en el PDAC.
- Confirmamos por qPCR (una técnica para medir la cantidad de ARN) que el gen PGLYRP1 estaba muy activo en las CSCs. También, mediante citometría de flujo (un método para contar y analizar características de las células), verificamos que la mayoría de las CSCs triple positivas mostraban PGLYRP1 en su superficie, mientras que las no CSCs tenían niveles muy bajos.

2.5. Experimentos de función: Pglyrp1 favorece la formación de "esferas" y protege de la muerte inducida por linfocitos T

- Para estudiar el efecto de Pglyrp1 en las CSCs, se hicieron dos aproximaciones:
 1. **Sobreexpresión (OE)**: forzar a las células a producir más Pglyrp1 de lo normal.
 2. **Silenciamiento / eliminación (KO)**: reducir o eliminar la capacidad de producir Pglyrp1, usando siRNA (ARN que "corta" el mensaje que produce la proteína) o CRISPR/Cas9 (técnica de edición genética)
- **Resultados sobre la capacidad de "esferificación"** (formar esferas en cultivo, indicador de propiedades de células madre):
 - Al sobreexpresar Pglyrp1 en células de ratón (línea KPC ID11) y humanas (línea Panc354), no cambió significativamente el número de esferas que formaban, pero sí crecieron más
 - Cuando se silenciaba o eliminaba Pglyrp1, las células perdían notablemente su capacidad de formar esferas; las CSCs se volvían menos "potentes" para renovarse.
- **Resultados sobre la sensibilidad a linfocitos T activados** (células inmunitarias que matan células tumorales):
 - Las CSCs que producían más Pglyrp1 resultaban más resistentes al ataque de linfocitos T en ensayos "in vitro" (en placas de cultivo), manteniendo mayor porcentaje de viabilidad tras 72 horas.
 - En cambio, al reducir Pglyrp1, las células eran mucho más susceptibles a ser eliminadas por los linfocitos T, lo que confirma que Pglyrp1 ayuda a las CSCs a "escapar" de la vigilancia inmunitaria.

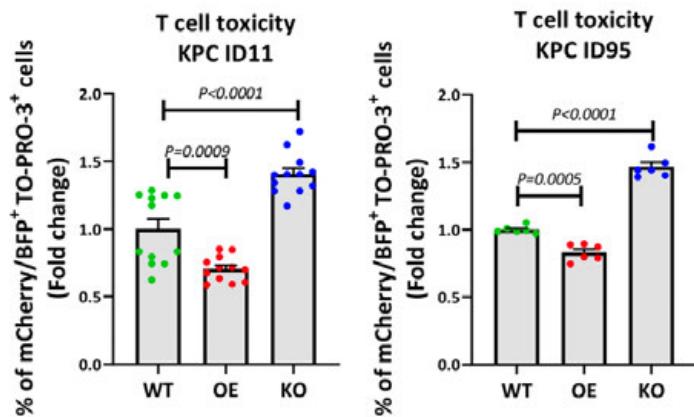


Figura 3: Cuantificación de células muertas (TO-PRO-3+) en la población tumoral (mCherry+/BFP+) para las células ID11 (izquierda) e ID95 (derecha), determinada por citometría de flujo y representada como cambio medio relativo \pm SEM, estableciendo el WT como 1,0 (n=12 para ID11 y n=6 para ID95; los valores de p se determinaron mediante ANOVA unidireccional con prueba post hoc de Tukey). Las células T se obtuvieron de los ganglios linfáticos y el bazo de tres ratones donantes diferentes.

2.6. Mecanismo molecular: interacción con receptores de muerte y proteínas asociadas

- Por estudios previos en otras células, se sabía que PGLYRP1 puede asociarse a la proteína HSP70 (una chaperona molecular) y luego inducir apoptosis (muerte celular) al unirse al receptor TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral alfa, TNFa).
- Sin embargo, si PGLYRP1 no está unido a HSP70, puede ocupar TNFR1 y bloquear así que el complejo PGLYRP1-HSP70 inducido por linfocitos T active la muerte celular. Es decir:
 - Linaje normal de muerte inducida:** los linfocitos T secretan PGLYRP1 unido a HSP70 → esa pareja se une a TNFR1 en la célula tumoral → desencadena apoptosis.
 - Escape de las CSCs:** las CSCs producen mucho Pglyrp1 “libre” que ocupa TNFR1 → el complejo PGLYRP1-HSP70 (llegado de los linfocitos T) no puede unirse y no se activa la apoptosis.
 - Papel de S100A4:** otra proteína llamada S100A4 (secreta por las propias CSCs o por las células estromales) se une a PGLYRP1 y HSP70 formando un “trímero” que tampoco deja que PGLYRP1 se una a TNFR1. Así, tanto la producción de Pglyrp1 por las CSCs como la presencia de S100A4 en el microambiente dificultan la activación del receptor de muerte TNFR1.
- Además, los tumores pueden atraer neutrófilos (otra clase de células inmunitarias), que también liberan PGLYRP1. Cuando muchos neutrófilos llegan al tumor y liberan PGLYRP1, amplían esa “protección” de las CSCs frente a la apoptosis. Al mismo tiempo, las CSCs secretan S100A4, que potencia la formación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) y la activación de monocitos/macrófagos en un bucle que favorece la supervivencia tumoral.

2.7. Ensayos de anticuerpos contra Pglyrp1 en ratones

- Se generaron clones de hibridomas en hámster que producían anticuerpos específicos contra Pglyrp1 de ratón.
- Estos anticuerpos se administraron a ratones KPC (modelos que desarrollan PDAC) tres veces por semana durante cuatro semanas, comparando el efecto con la quimioterapia estándar (gemcitabina).
- **Resultado inesperado (negativo):** a pesar de que los anticuerpos reconocían Pglyrp1 en pruebas de laboratorio (Western blot), no se observó ninguna reducción significativa en el peso de los tumores de los ratones tratados con anti-Pglyrp1 respecto a los controles. Se barajan varias explicaciones para este resultado:
 1. Tal vez neutralizar Pglyrp1 en el animal no tenga un impacto biológico real (es decir, no sea suficiente por sí solo).
 2. Los anticuerpos generados no eran lo bastante efectivos para inactivar Pglyrp1 in vivo (quizá solo funcionaban en pruebas de laboratorio pero no al inyectarlos en el ratón).
 3. Dado que el cáncer de páncreas está mal vascularizado (pocos vasos que lleven sangre al tumor), tal vez los anticuerpos no llegaban en cantidad suficiente al interior del tumor para hacer su efecto.
- Como alternativa, se creó un nuevo modelo de ratón “condicional” (KPCP^{−/−}) en el que el gen Pglyrp1 estaba eliminado específicamente en el páncreas. Así se comprobó si la ausencia total de Pglyrp1 desde el origen afectaba el desarrollo del tumor.
- En estos ratones KPCP^{−/−}:
 - No se detectaba Pglyrp1 en el páncreas (comprobando que el modelo funcionaba).
 - A las 14 semanas de vida, tenían menos lesiones precancerosas (PanINs) y menos cáncer de páncreas establecido que los ratones KPC con Pglyrp1 intacto.
- Estos resultados indican que la eliminación genética de Pglyrp1 frena el desarrollo y la agresividad del cáncer de páncreas en ratones, apoyando la idea de que **targetear** Pglyrp1 debería tener un efecto positivo. Por ello se están produciendo ahora anticuerpos policlonales en conejo, con la esperanza de contar con herramientas más potentes para los ensayos futuros.

2.8. Implicaciones clínicas: Pglyrp1 como posible biomarcador

- Además de estudiar la función de Pglyrp1 en el tumor, se quiso saber si el nivel de esta proteína podía servir como **marca en sangre** para detectar o seguir la evolución de la enfermedad.

- Se midieron los niveles de Pglyrp1 (en pico gramos por mililitro) en suero de 99 pacientes con PDAC y 27 controles sanos, todos procedentes del Hospital Ramón y Cajal.
- Se observó un **aumento muy significativo** de Pglyrp1 en la sangre de los pacientes con cáncer de páncreas respecto a los controles.
- Esto sugiere que Pglyrp1 podría emplearse como **biomarcador** de PDAC, aunque haría falta confirmar si aparece también en estadios tempranos o en pacientes con factores de riesgo (por ejemplo, historia familiar de PDAC.)

3. Hipótesis original y objetivos (metas planteadas al inicio)

El proyecto partía de la idea de que **Pglyrp1 está presente en las CSCs del cáncer de páncreas** y que esta proteína les ayuda a “escapar” del sistema inmune. Para validar esto se plantearon tres líneas principales de trabajo:

1. **Validar el papel de Pglyrp1 en el escape inmunológico:**

- Silenciar y sobreexpresar Pglyrp1 en células de PDAC (tanto de ratón como humanas) y comprobar en cultivos y en ratones si estas células se protegen o se vuelven más vulnerables al ataque de los linfocitos T.

2. **Determinar el mecanismo molecular de protección:**

- Saber si Pglyrp1 interacciona con la proteína S100A4 o con HSP70, y si esto afecta la formación del complejo que induce la muerte celular a través del receptor TNFR1.

3. **Desarrollar anticuerpos contra Pglyrp1 y probar su eficacia:**

- Generar hibridomas (células que producen anticuerpos) que ataquen específicamente Pglyrp1 en ratón.
- Evaluar en modelos animales si estos anticuerpos, solos o junto a los tratamientos habituales (por ejemplo, quimioterapia o anticuerpos anti-PD-L1), logran frenar el crecimiento tumoral y las metástasis.

4. Detalles de los estudios y sus resultados

4.1. **Expresión de PGLYRP1 en tumores y en células del sistema inmune**

- Con ratones KPC, se demostró que la **expresión de PGLYRP1 aumenta** a medida que progresla enfermedad.
- Además, se observó que **no solo las propias células tumorales** expresan PGLYRP1, sino que también algunas células inmunitarias infiltradas en el tumor, como los neutrófilos, muestran niveles altos. Esto sugiere que los neutrófilos pueden aportar Pglyrp1 al entorno tumoral, reforzando la protección de las CSCs.

4.2. Detalles del Aim 1: Sobreexpresión y silenciamiento de Pglyrp1

- **Sobreexpresión (OE, "overexpression"):**
 - Se transfecaron (introdujeron) vectores que aumentan la síntesis de Pglyrp1 en dos líneas celulares: KPC ID11 (ratón) y Panc354 (humana).
 - Con esa sobreproducción, las células formaron esferas de mayor tamaño (indicando mayor potencial de crecimiento), aunque no aumentó el número de esferas. Esto muestra que Pglyrp1 no influye en la frecuencia de las CSCs, pero sí en su capacidad de expansión.
- **Silenciamiento/edición genética (KO via CRISPR/Cas9 y siRNA):**
 - Al eliminar Pglyrp1, las células mostraron una fuerte caída en la capacidad de formar esferas. Las CSCs perdían así su principal rasgo de "autorenovación".

4.2.1. Ensayos de muerte inducida por linfocitos T

- Se pusieron en contacto las CSCs (con diferentes niveles de Pglyrp1) con linfocitos T previamente activados.
- A las 72 horas se midió el porcentaje de células vivas:
 - **Células con Pglyrp1 sobreexpresado:** mayor resistencia, más porcentaje de células vivas.
 - **Células con Pglyrp1 reducido o eliminado:** mucha más sensibilidad a la muerte por linfocitos T.

Esto confirma el papel protector de Pglyrp1 frente al sistema inmune.

4.3. Detalles del Aim 2: Mecanismo molecular

- **Hipótesis de trabajo:**
 1. Los linfocitos T secretan complejos PGLYRP1–HSP70 que, al unirse a TNFR1 en la célula tumoral, desencadenan apoptosis.
 2. Cuando las CSCs producen Pglyrp1 en gran cantidad, esta proteína sola se une a TNFR1 y bloquea el sitio donde iría el complejo PGLYRP1–HSP70 (proveniente de linfocitos T), impidiendo la señal de muerte.

3. Adicionalmente, la proteína S100A4 que producen las células tumorales puede unirse a Pglyrp1 y HSP70, formando un “trímero” que tampoco deja que PGLYRP1 induzca apoptosis. Por tanto, Pglyrp1 y S100A4 trabajan en conjunto para proteger a las CSCs de la señal de muerte.

- **Papel de los neutrófilos:**

- Cuando los neutrófilos llegan al tumor, pueden liberar Pglyrp1 (en forma de redes extracelulares de neutrófilos, NETs). Esto crea un entorno aún más protector para las CSCs y favorece la activación de monocitos/macrófagos que, paradójicamente, suelen contribuir a la progresión tumoral en el PDAC.

4.4. Detalles del Aim 3: Desarrollo de anticuerpos anti-Pglyrp1

- **Producción de anticuerpos en hámster (hibridomas)**

- Se obtuvieron varios clones que producían anticuerpos contra Pglyrp1 de ratón.
 - Se comprobó mediante Western blot que, en condiciones de laboratorio, el anticuerpo detecta la proteína Pglyrp1 recombinante y la presente en células tumorales.

- **Ensayo in vivo en ratones KPC:**

- Ratones KPC con tumor ya establecido recibieron 500 µg de anticuerpo anti-Pglyrp1 por vía intraperitoneal tres veces por semana, durante 4 semanas.
 - Como control, otro grupo recibió gemcitabina (la quimioterapia estándar) y se comparó el peso del tumor al final del experimento.
 - **Resultado negativo:** no hubo diferencia estadística en el peso tumoral entre ratones tratados con el anticuerpo y los controles. Incluso al aumentar la dosis y la frecuencia de inyecciones, no se observó efecto sobre el crecimiento tumoral. ○ Posibles explicaciones:

1. El bloqueo de Pglyrp1 en el ratón no es suficiente para alterar la progresión del PDAC.
2. Los anticuerpos generados no eran lo bastante potentes para neutralizar Pglyrp1 dentro del microambiente tumoral.
3. El tumor de páncreas tiene poca irrigación sanguínea, por lo que los anticuerpos no alcanzan concentraciones útiles en su interior.

- **Generación del modelo genético KPCT^{+/+}:**

- Se cruzaron ratones KPC con otros ratones en los que era posible eliminar (condicionalmente) el gen Pglyrp1 en el páncreas.

- o El resultado fueron ratones "KPCT-/-" que no producen Pglyrp1 en el tejido pancreático desde el nacimiento.

Observaciones en KPCT+/+:

- o Alas 14 semanas mostraban menos lesiones precancerosas (PanINs) y menor tejido canceroso (PDAC) que los KPC normales.
- o Estos hallazgos validan la hipótesis de que **la ausencia de Pglyrp1 frena la progresión y agresividad del cáncer de páncreas.**

4.5. Implicaciones clínicas y biomarcador

Se analizó la presencia de Pglyrp1 en el suero (sangre) de 99 pacientes con cáncer de páncreas y 27 personas sanas.

Los pacientes con PDAC tenían niveles de Pglyrp1 significativamente más altos que los controles sanos.

Esto indica que Pglyrp1 podría servir como **un marcador de sangre** para ayudar en el diagnóstico o seguimiento del cáncer de páncreas, aunque haría falta hacer estudios adicionales para determinar su utilidad en estadios tempranos o en casos hereditarios.

5. Conclusiones generales y perspectivas

1. Importancia de las CSCs en el PDAC:

- o Las células madre del cáncer (marcadas como EPCAM+SCA1+CD133+) son fundamentales en la agresividad y resistencia al tratamiento del adenocarcinoma de páncreas.
- o Identificar y atacar estas CSCs es clave para lograr remisiones duraderas.

2. Papel clave de Pglyrp1 en el escape inmunológico:

- o Pglyrp1 se muestra como una proteína sobreexpresada en las CSCs y también producida por neutrófilos infiltrados en el tumor.
- o Funciona bloqueando el receptor de muerte TNFR1, impidiendo que los linfocitos T activen la apoptosis en las CSCs.
- o Además, la interacción de Pglyrp1 con S100A4 y HSP70 en el microambiente tumoral refuerza aún más esa protección.

3. Posibilidades terapéuticas:

- o Aunque los anticuerpos generados en este proyecto contra Pglyrp1 no lograron reducir el tamaño tumoral en ratones KPC, la eliminación genética de Pglyrp1 (en los ratones KPCT-/-) sí redujo la aparición de cáncer y metástasis.

- o Esto sugiere que, si se consigue un anticuerpo o una molécula pequeña suficientemente eficaz que llegue bien al tumor, bloquear Pglyrp1 podría ser una estrategia terapéutica válida para reforzar la inmunoterapia (o combinarse con la quimioterapia y los anticuerpos anti-PD-L1).
- o Actualmente se están desarrollando anticuerpos policlonales en conejo con la esperanza de lograr más eficacia "in vivo".

4. Pglyrp1 como biomarcador de PDAC:

- o El hallazgo de niveles elevados de Pglyrp1 en sangre de pacientes con cáncer de páncreas abre la posibilidad de usarlo como marcador diagnóstico o de seguimiento.
- o Habrá que determinar su sensibilidad y especificidad en estudios más amplios, así como verificar si se eleva en fases muy tempranas del tumor o en casos hereditarios.

5. Líneas futuras de investigación:

- o Seguir analizando el microambiente tumoral para entender mejor el papel de neutrófilos y macrófagos que, influenciados por Pglyrp1 y S100A4, pueden favorecer la progresión del cáncer.
- o Buscar combinaciones de anticuerpos y quimioterapia/inmunoterapia que potencien la presentación de antígenos y permitan al sistema inmune reconocer y destruir las CSCs.
- o Investigar si hay otros receptores de escape en las CSCs que trabajen junto a Pglyrp1 para mantener su resistencia.
- o Extender el estudio del biomarcador a poblaciones más amplias de pacientes y a aquellos con pancreatitis crónica u otros factores de riesgo, para valorar su uso en detección precoz.

6. Publicaciones y presentaciones relacionadas

A. Conferencias invitadas

- Nuevas líneas de investigación en cáncer de páncreas. XVI Reunión de la Asociación Española de Pancreatología (AESPANC), Bilbao, España, septiembre 19-21, 2019.
- Circulating Cancer Stem Cells and their interactions with macrophages. Next Frontiers to Cure Cancer 2018, São Paulo, Brasil, mayo 10, 2018.
- The ever-evolving concept of the cancer stem cell in pancreatic cancer. 2nd International Conference - Cancer Stem Cells: Impact on Treatment, Seefeld-in-Triol, Austria, diciembre 12-15, 2018.
- Nuevas líneas de investigación en cáncer de páncreas. Seminario Virtual "LUIS 4 Cancer" (AEI/FEDER, UE), mayo 19, 2020.

- The ever-changing landscape of pancreatic cancer stem cells. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Córdoba, España, abril 12, 2018.
- Circulating Cancer Stem Cells and their interactions with macrophages. Next Frontiers to Cure Cancer 2018, São Paulo, Brasil, mayo 10, 2018.
- The Cancer Stem Cells Concept: Heterogeneity and Plasticity. A.C. Cariago Cancer Center, São Paulo, Brasil, mayo 9, 2018.

B. Artículo publicado

1. **Valle S., Alcalá S., Martín-Hijano L., Cabezas-Sainz P., Navarro D., Ramos Muñoz E., Yuste L., Tiwary K., Walter K., Alonso-Nocelo M., Rubiolo J.A., González-Arnay E., García-Bermejo L., Hermann P.C., Sánchez L., Sancho P., Fernández-Moreno M.A., Sainz B. Jr.** "Explotando la fosforilación oxidativa para promover las propiedades de célula madre e inmunoevasión de las células madre del cáncer de páncreas". *Nature Communications*. 16 de octubre de 2020; 11:5265. PMID: 33067432. 2019: 12.121 (Q1 D1).
2. **López-Gil J.C., García-Silva S., Ruiz-Cañas L., Navarro D., Palencia-Campos A., Giráldez-Trujillo A., Earl J., Dorado J., Gómez-López G., Monfort-Vengut A., Alcalá S., Gaida M.M., García-Mulero S., Cabezas-Sáinz P., Batres-Ramos S., Barreto E., Sánchez-Tomero P., Vallespinós M., Ambler L., Lin M.L., Aicher A., García García de Paredes A., de la Pinta C., Sanjuanbenito A., Ruz-Caracuel I., Rodríguez-Garrote M., Guerra C., Carrato A., de Cárcer G., Sánchez L., Nombela-Arrieta C., Espinet E., Sanchez-Arevalo Lobo V.J., Heeschen C., and Sainz B. Jr.** "The Peptidoglycan Recognition Protein 1 Confers Immune Evasive Properties on Pancreatic Cancer Stem Cells." *Gut*, 2024 Aug 8;73(9):1489-1508. PMID: 38754953. Factor de Impacto IF: 25 (Q1 D1).

7. Referencias bibliográficas

1. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. "Cáncer a pesar de la inmunovigilancia: inmunoselección e inmunosubversión". *Nature Reviews Immunology* 2006; 6(10): 715-27.
2. Xu Z., Pothula S.P., Wilson J.S., Apte M.V. "Cáncer de páncreas y su estroma: una teoría de la conspiración". *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(32): 11216-29.
3. Inman K.S., Francis A.A., Murray N.R. "Papel complejo del sistema inmune en la iniciación y progresión del cáncer de páncreas". *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(32): 11160-81.
4. Azuma T., Yao S., Zhu G., Flies A.S., Flies S.J., Chen L. "B7-H1 es un receptor antiapoptótico ubicuo en células cancerosas". *Blood* 2008; 111(7): 3635-43.
5. Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. "Un gen anti-apoptótico nuevo, survivina, expresado en cáncer y linfoma". *Nature Medicine* 1997; 3(8): 917-21.

6. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., et al. "Poblaciones distintas de células madre del cáncer determinan el crecimiento tumoral y la actividad metastásica en cáncer de páncreas humano". *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 313-23.
7. Hingorani S., Wang L., Multani A., et al. "Trp53 y Kras cooperan para promover la inestabilidad cromosómica y un adenocarcinoma ductal de páncreas ampliamente metastásico en ratones". *Cancer Cell* 2005; 7(5): 469-83.
8. Goldman S.M., Kamel F., Ross G.W., et al. "Genes de proteínas de reconocimiento de peptidoglicano y riesgo de enfermedad de Parkinson". *Movement Disorders* 2014; 29(9): 1171-80.
9. Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., et al. "Tag7 (PGLYRP1) en complejo con Hsp70 induce procesos citotóxicos alternativos en células tumorales vía receptor TNFR1". *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(35): 21724-31.
10. Dukhanina E.A., Yashin D.V., Galkin A.V., Sashchenko L.P. "Acciones inesperadas de proteínas familiares: interacción de Hsp70, PGRP-S/Tag7 y S100A4/Mts1 en la batalla cuerpo vs. cáncer". *Cell Cycle* 2010; 9(4): 676-82

Agradecimientos y nota final

Este trabajo fue posible gracias a la **Beca Carmen Delgado/Miguel Pérez-Mateo**, la colaboración de múltiples investigadores y técnicos, así como la infraestructura de la Universidad Autónoma de Madrid y los servicios del Hospital Ramón y Cajal para la obtención de muestras de sangre de pacientes. Aunque se han logrado avances significativos, queda mucho por investigar para trasladar estos hallazgos al beneficio clínico directo de quienes padecen cáncer de páncreas. La comprensión de cómo las células madre tumorales evaden al sistema inmune abre nuevas oportunidades para diseñar terapias más efectivas, que complementen las opciones actuales y mejoren el pronóstico de esta enfermedad tan agresiva.



Beca 2018 (Básica)

Carmen Guerra:

Doctorado en Microbiología e Inmunología en la La Dra Guerra es farmacéutica y bióloga molecular con más de 30 años de experiencia en investigación en biología molecular, y más de 20 años dedicados específicamente al estudio del cáncer de páncreas. Obtuvo su doctorado en 1994 en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), donde estudió los mecanismos moleculares que regulan el tejido adiposo marrón bajo la supervisión de las doctoras Margarita Fernández y Manuel Benito. Tras finalizar su doctorado, realizó una estancia postdoctoral en The Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.) en el laboratorio del Dr. Leslie P. Kozak. Allí, desarrolló modelos de ratón modificados genéticamente para investigar la base genética de la obesidad.

Desde 1998, la Dra. Guerra ha sido una integrante clave del laboratorio del Dr. Mariano Barbacid en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), donde su investigación se ha centrado principalmente en la tumorigénesis impulsada por Ras, con un enfoque especial en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de modelos de ratón genéticamente modificados que reproducen el cáncer de páncreas humano. Estos modelos han sido esenciales para elucidar los mecanismos moleculares de iniciación y progresión tumoral, así como para desarrollar y validar nuevas estrategias terapéuticas en entornos preclínicos.

TITULO:

Desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra el estroma del cáncer de páncreas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Carmen Guerra

Introducción:

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer más letales. A diferencia de otros tumores, sus tasas de incidencia y mortalidad han aumentado en los últimos años. Se trata de un cáncer que, en la mayoría de los casos, se diagnostica en etapas avanzadas, cuando ya hay metástasis (extensión a otros órganos), lo que reduce drásticamente las posibilidades de tratamiento exitoso.

Además, no existen buenos métodos para detectarlo de manera temprana, y los tratamientos actuales apenas han cambiado en los últimos 20 años. Fármacos como la gemcitabina, aunque se han utilizado ampliamente, apenas aumentan la supervivencia en cuestión de semanas. Las combinaciones con otros medicamentos tampoco han logrado avances significativos.

Frente a este panorama, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en entender mejor cómo se desarrolla este tipo de tumor, para poder encontrar nuevas formas de combatirlo.

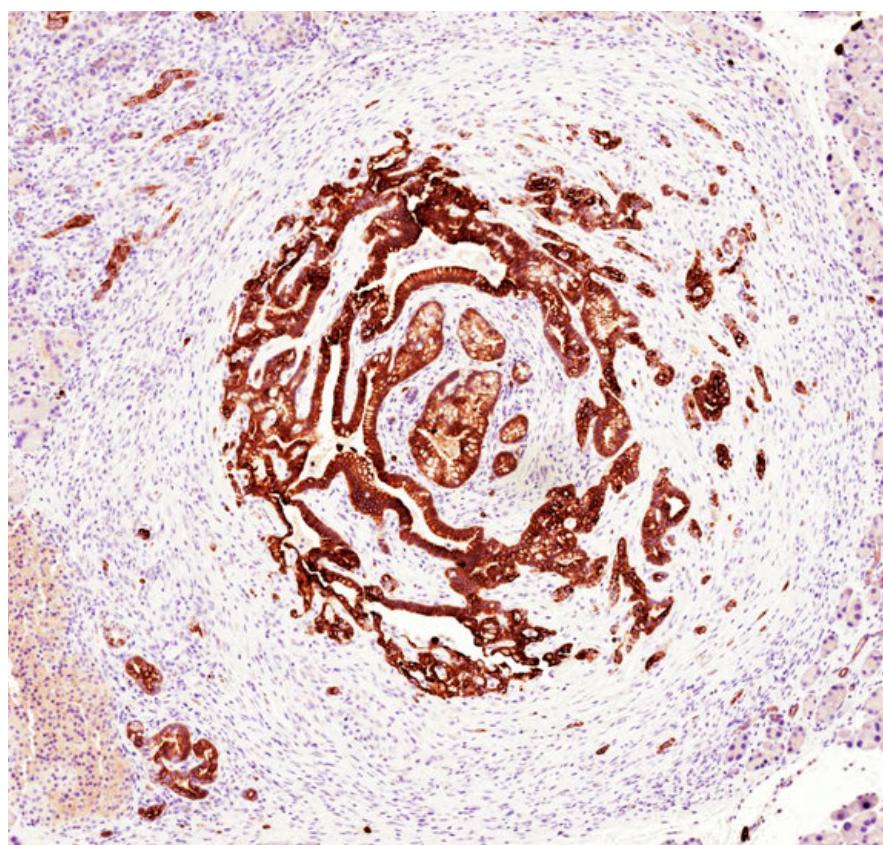


Figura 1: Ejemplo de un corte histológico de un tumor de páncreas de ratón.

El tumor está delimitado por líneas intermitentes. Las células tumorales están marcadas en marrón (expresan un marcador de células ductales: citoqueratina 19). Como se ve en la imagen, estas células tumorales están rodeadas por células que no expresan este marcador, que son principalmente fibroblastos.

¿Qué hace único al cáncer de páncreas?

Una de las características más llamativas del adenocarcinoma pancreático (el tipo más común de cáncer de páncreas) es su composición. No está formado solo por células tumorales, sino que contiene un componente llamado estroma, que puede representar más del 90% del tumor (Figura 1). Este estroma está compuesto por:

- Fibroblastos (un tipo de célula que produce fibras y colágeno)
- Células inmunes (como los macrófagos)
- Una densa red de proteínas y otros componentes que dificultan la entrada de fármacos y de células defensivas del organismo

El estroma no solo protege al tumor, sino que también lo alimenta y lo ayuda a crecer. Por eso, se ha convertido en un objetivo clave para el desarrollo de nuevas terapias.

Un nuevo enfoque: atacar al estroma

Durante mucho tiempo, se pensó que lo mejor era **eliminar** el estroma para facilitar el tratamiento. Sin embargo, varias investigaciones demostraron que hacerlo puede resultar en tumores aún más agresivos. ¿Por qué? Porque algunos elementos del estroma también ayudan a contener el crecimiento del tumor.

Por eso, **en lugar de eliminar el estroma, se busca "reprogramarlo"**, es decir, modificarlo para que deje de colaborar con el tumor y se convierta en un aliado de la terapia.

Nuestro modelo de estudio

Para poder estudiar estas complejas interacciones, hemos trabajado con modelos experimentales muy avanzados:

- **Ratones modificados genéticamente** que desarrollan tumores pancreáticos muy similares a los humanos.
- **Organoides**, que son pequeñas réplicas de tumores humanos cultivadas en el laboratorio, y que permiten ensayar tratamientos de forma muy precisa.

Un hallazgo prometedor: el gen Saa3

En nuestro laboratorio quisimos estudiar los fibroblastos del estroma tumoral, los **CAFs**, que juegan un papel clave en ayudar al tumor a crecer. Al comparar los fibroblastos de tumores de páncreas (CAFs) y los fibroblastos normales de páncreas (NP) encontramos genes que estaban diferencialmente expresados en los tumores. El que se encontraba más elevado era el gen Saa3 (**Figura 2**).

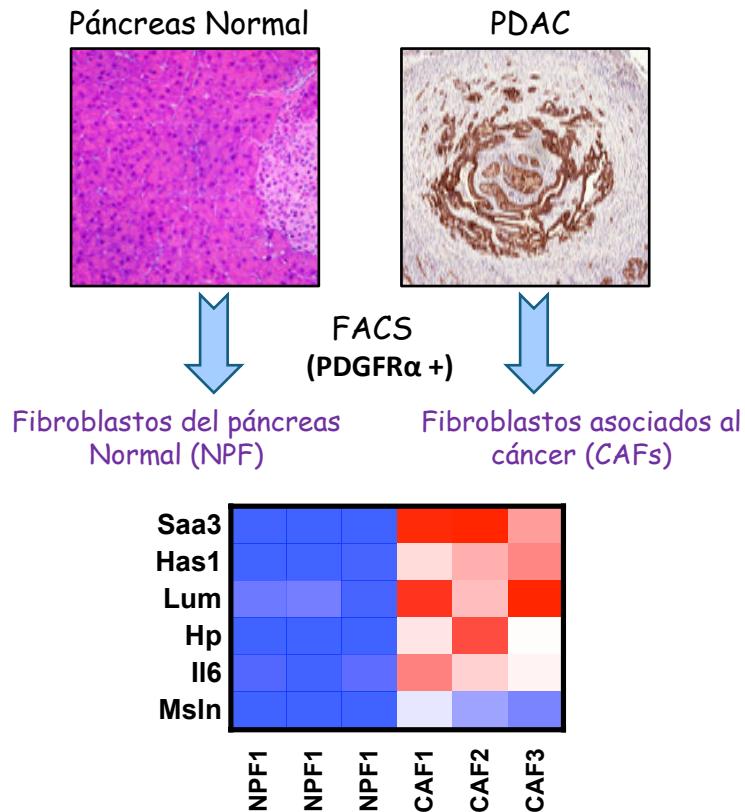


Figura 2: Hemos realizado un estudio comparativo de los fibroblastos normales (NPF) del páncreas y de fibroblastos de tumores de páncreas (CAFs). Estos fibroblastos se aislaron por citometría (FACS), estudiando los fibroblastos que expresaban un marcador relacionado con la inflamación: PDGFR α . De este estudio comparativo se obtuvo un listado de genes diferencialmente expresados. En rojo (altos niveles de expresión). En azul (bajos niveles de expresión). Saa3 estaba muy elevado en CAFs.

Este gen se asocia a procesos inflamatorios y al cáncer. Lo más interesante es que:

- **Saa3 es casi exclusivo de los CAFs tumorales**, no aparece en fibroblastos normales
- Su presencia está relacionada con mayor crecimiento tumoral
- Cuando bloqueamos este gen en los CAFs, **los tumores se hacen más pequeños**

Además, identificamos que Saa3 actúa a través de otra proteína llamada **Mpp6**, presente en la membrana de estas células. Al interrumpir esta relación, se reduce notablemente el efecto negativo del estroma sobre la evolución del tumor.

¿Qué ocurre en humanos?

En humanos, el gen equivalente a Saa3 se llama **SAA1**. Descubrimos que:

- SAA1 también se encuentra sobreexpresado en fibroblastos tumorales humanos (según datos de bases como The Cancer Genome Atlas)
- Los pacientes con más SAA1 en sus tumores tienen peor pronóstico
- SAA1 parece funcionar de forma similar a Saa3 en los modelos de ratón, lo que **refuerza su potencial como diana terapéutica**

¿Qué estudiamos gracias a este proyecto?

Basándonos en lo anteriormente expuesto y en nuestros datos previos nuestros objetivos eran seguir avanzando en tres direcciones:

1. **Estudiar en profundidad el papel de Saa3**, no solo en fibroblastos (CAFs), sino también en macrófagos, otro tipo de célula presente en el estroma que también expresa este gen en niveles muy altos.
2. **Hemos desarrollado ratones modificados** en los que podamos eliminar Saa3 de forma específica en los CAFs, en los macrófagos o en todo el cuerpo, para ver qué estrategia terapéutica ofrece mejores resultados.
3. **Validar nuestros hallazgos en organoides de tumores humanos**, para confirmar que lo que observamos en ratones también se aplica en tumores humanos.

Resultados principales

- Identificamos al gen **Saa3/SAA1** como un **nuevo actor clave** en el estroma del cáncer de páncreas.
- Bloquear Saa3 en fibroblastos tumorales reduce de forma notable el tamaño del tumor.
- La acción de Saa3 está mediada por una proteína específica (Mpp6), lo que ofrece una vía concreta para el desarrollo de nuevos tratamientos.
- Los resultados se observaron tanto en modelos animales como en tumores humanos, lo que **refuerza la aplicabilidad clínica**.

Conclusiones

Nuestro estudio refuerza la idea de que el **estroma es un componente activo** que influye decisivamente en su desarrollo y en la resistencia a tratamientos.

- En lugar de eliminarlo, se puede **reprogramar** para frenar el avance del cáncer.
- Genes como **Saa3 (en ratón) o SAA1 (en humanos)** representan **nuevas dianas terapéuticas** que pueden abrir el camino a tratamientos más eficaces y personalizados para el cáncer de páncreas.
- Este enfoque, centrado en el microambiente tumoral, podría finalmente ofrecer una salida a una enfermedad que hoy en día tiene muy pocas opciones efectivas.

Impacto y proyección futura

El cáncer de páncreas sigue siendo uno de los más difíciles de tratar. Este proyecto aporta una nueva perspectiva centrada en el entorno que rodea al tumor, no en el tumor en sí.

Si conseguimos **modular el estroma** para que deje de apoyar al cáncer, y al mismo tiempo facilitar el acceso de los tratamientos y del sistema inmunitario, podríamos lograr avances significativos.

Nuestros resultados sientan las bases para desarrollar nuevos fármacos o terapias combinadas que actúen sobre el eje **Saa3/Mpp6 o SAA1/MPP6**, con el objetivo de mejorar la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad tan agresiva.



Beca 2018 (Clínica)

Nuria Malats:

La Dra. Núria Malats es experta en epidemiología genética y molecular especializada en cáncer de páncreas y cáncer de vejiga urinaria. Ha liderado importantes proyectos de investigación nacionales e internacionales, como PanGenEU, SBC/EPICURO, e ISBlaC, integrando datos epidemiológicos, clínicos, ómicos (genómicos, microbioma) y de imagen.

Con más de 350 publicaciones (índice h: 96), ha obtenido financiación competitiva de organizaciones nacionales (ISCIII, AECC, Beca Carmen Delgado y Miguel Pérez Mateo) e internacionales (PCC-SU2C en USA y la UE). Ha dirigido numerosas tesis doctorales, organizado congresos y contribuido a consorcios internacionales como PanScan y PanC4.

Como presidenta de ALIPANC y del área de investigación de Pancreatic Cancer Europe (PCE), trabaja para concienciar y promover la investigación del cáncer de páncreas a nivel mundial.

TITULO:

Marcadores microbianos para el diagnóstico del adenocarcinoma ductal de páncreas.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Nuria Malats

Grupo de Epidemiología Genética y Molecular (GMEG)

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

La financiación procedente de la beca C.Delgado/M. Perez concedida el año 2018 ha apoyado e impulsado la línea de investigación sobre cáncer de páncreas, microbioma y metaboloma del GMEG.

En concreto, la ayuda económica se utilizó para completar la recogida, procesamiento y almacenaje de las muestras del estudio PanGen-Mic con las que se han llevado a cabo varias determinaciones y análisis en colaboración con los laboratorios de los profesores:

Peer Bork, Unidad de Biología Estructural y Computacional, Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), Heidelberg, y Departamento de Bioinformática, Biocentro, Universidad de Würzburg, Würzburg, Alemania

Xavier Correig, Laboratorio Interdisciplinario de Metabolómica, Departamento de Ingeniería Electrónica, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, e Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, España.

Asimismo, estos recursos económicos permitieron al estudiante de doctorado Francisco (Fran) Jurado atender y presentar su trabajo en reuniones científicas, lo que ha permitido completar su formación.

Los principales resultados científicos derivados de la ayuda son:

1. Tesis doctoral de Fran Jurado que será depositada después de verano y defendida a finales del 2025 en el Programa de Doctorado Epidemiología y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Madrid con el título "Integración de datos microbiológicos, metabolómicos y epidemiológicos en la predicción del riesgo de cáncer de páncreas."
2. Artículo científico 1. Una firma de microbiota fecal con alta especificidad para el cáncer de páncreas Kartal E, Schmidt TSB, Molina-Montes E, Rodríguez-Perales S, Wirbel J, Maistrenko OM, Akanni WA, Alashkar Alhamwe B, Alves RJ, Carrato A, Erasmus HP, Estudillo L, Finkelmeier F, Fullam A, Glazek AM, Gómez-Rubio P, Hercog R, Jung F, Kandels S, Kersting S, Langheinrich M,

Márquez M, Molero X, Orakov A, Van Rossum T, Torres-Ruiz R, Telzerow A, Zych K; MAGIC Study investigators; PanGenEU Study investigators; Benes V, Zeller G, Trebicka J, Real FX, Malats N*, Bork P*. A faecal microbiota signature with high specificity for pancreatic cancer. Gut 2022;71(7):1359-1372. doi: 10.1136/gutjnl- 2021-324755. (* co-senior authors)

Gut es una revista de alto impacto en el campo de la Gastroenterología. Su factor de impacto en el año de publicación del artículo (2022) fue de 23.06. La revista galardonó el artículo como GutTop Paper 2022 por el alto número de citaciones ciencíficas. Además, el artículo tuvo mucha repercusión mediática a nivel nacional, europea y en Sudamérica.

3. Artículo científico 2. Integración de perfiles metabolómicos multicapa de suero, heces y orina para la predicción del riesgo de cáncer de páncreas.

Jurado F, Cumeras R, Sabroso-Lasa S, Amigó N, Alonso L, López de Maturana E, Molina- Montes E, Molero X, Carrato A, Real FX, Correig X*, Malats N*, on behalf of the PanGenEU investigators. (* co-senior authors)

El manuscrito se encuentra en revisión en GUT.

4. Artículo Científico 3. Microbiota oral y fecal asociada al riesgo y pronóstico del cáncer de páncreas.

Jurado F, Molina E, Kartal E, Alonso L, Schmidt TSB, Estudillo L, Gómez-Rusbio P, Sabroso S, López de Maturana E, Calle ML, Molero X, Carrato A, Real FX, Bork P*, Malats N*, on behalf of the PanGenEU Study investigators. (* co-senior authors)

Existe un borrador final del manuscrito que se va a someter para publicación en las próximas semanas.

5. Análisis preliminares sobre las correlaciones entre el microbioma y el metaboloma en el contexto del adenocarcinoma ductal pancreático.

Francisco Jurado, Lola Alonso, Sergio Sabroso, Evangelina López de Maturana, Esther Molina-Montes, Paco Real, Núria Malats.

6. Análisis preliminares sobre cambios en el viroma en el cáncer de páncreas: nuevos conocimientos de la metagenómica no dirigida.

Pablo Viloslada-Blanco, Lola Alonso, Francisco Jurado-Rueda, Núria Malats.

A continuación, detallo estas contribuciones:

Tesis Doctoral Fran Jurado. Integración de datos microbiológicos, metabolómicos y epidemiológicos en la predicción del riesgo de cáncer de páncreas

Fran Jurado consiguió una Ayuda para Contratos de Predoctorales para la formación de Doctores del Ministerio de Ciencia e Innovación (FPI, PRE-C-2020-0021) para realizar su tesis. Esta se enmarca en el estudio de la población de riesgo para desarrollar cáncer de páncreas integrando datos ómicos y no ómicos. En concreto, en la tesis se exploran e integran los marcadores derivados del microbioma oral y fecal y el metaboloma de suero, orina y fecal en relación a la asociación y predicción del riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.

Los objetivos específicos de la tesis son: (1) Asociar el riesgo de Adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) con perfiles microbianos y metabólicos individuales específicos. (2) Asociar perfiles microbianos y metabólicos específicos con las condiciones y exposiciones del huésped. (3) Explorar la asociación de la integración microbiana y metabólica con el riesgo de cáncer de páncreas. (4) Predecir el riesgo de cáncer de páncreas en función de las firmas/puntuaciones de microbios y metabolitos. (5) Mejorar la precisión de la predicción mediante la combinación de capas micro y metabolómica complementarias.

Fran ha cumplido con creces los objetivos previstos en su doctorado. El nivel de aprovechamiento ha sido muy alto con resultados relevantes. Entre los logros conseguidos también están la publicación de un artículo en *BioinformaPcs Advances* (2023) (PMID: 36874954), la sumisión de un artículo en *GUT* (IF: 25,8) sobre metaboloma que está en revisión, el borrador final del artículo sobre microbioma que está a punto de someterse a publicación, los resultados avanzados sobre integración metaboloma-microbioma, el borrador avanzado de su tesis doctoral.

Entre las actividades realizadas por Fran durante su doctorado se encuentran el Máster en Bioinformática (UAM) y Máster en métodos estadísticos (UCM), La presentación de los resultados derivados de su actividad científica en 20 reuniones científicas nacionales e internacionales, una estancia de 1 mes en un centro colaborador experto en metabolómica en la Universidad Rovira y Virgili en la que se formó sobre los pasos de preprocesamiento y requerimientos para la Cromatografía gaseosa y Líquida, seguida de la Espectrometría de Masas y con la tecnología de Resonancia Magnética Nuclear. Los datos cuantificados en esta fase forman parte vital del tercer y cuarto objetivo de esta tesis.

Durante su doctorado, Fran ha ido adquiriendo las habilidades necesarias para la consecución de su investigación. No solamente el Máster en Bioinformática (UAM) le ha provisto de las herramientas requeridas para la interpretación de resultados biológicos según la información procedente de grandes bases de datos públicas, también el Máster en estadística (UCM) le ha permitido asentar las bases para llevar a cabo análisis estadísticos sofisticados en relación a la integración de datos ómicos y no-ómicos.

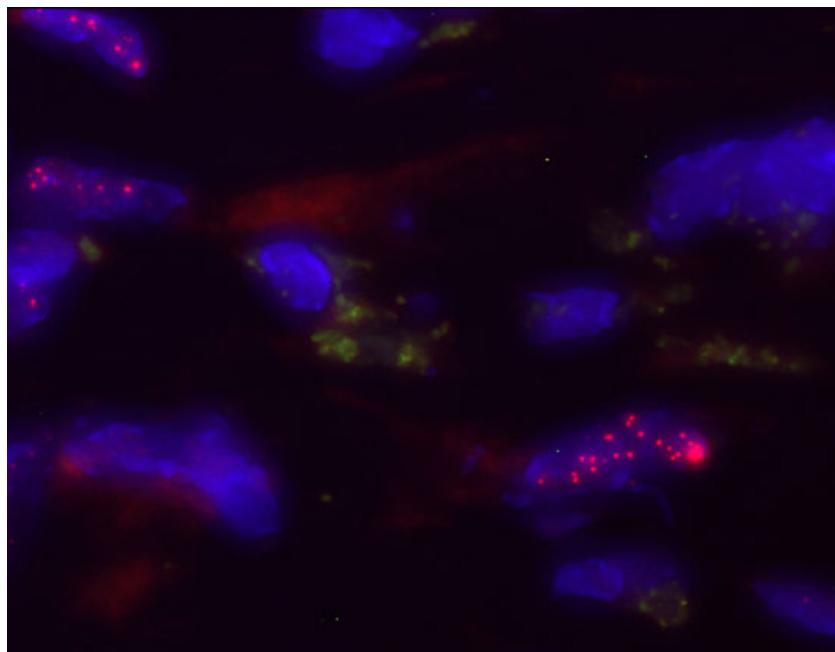
En conclusión, Fran ha llevado a cabo su doctorado de forma excelente demostrando ser un investigador independiente para poder realizar un postdoctorado en un grupo de referencia internacional. La tesis doctoral del Fran está a punto de ser terminada y depositada. Tenemos previsto que su defensa sea a finales del 2025.

Artículo científico 1. Kartal E, Schmidt TSB, Molina-Montes E, et al. *Gut* 2022.

Evidencias previas apuntaban al papel del microbioma en la etiología y progresión del cáncer de páncreas. En este estudio pretendíamos explorar la microbiota fecal y salival como posibles biomarcadores diagnósticos del cáncer de páncreas. Para ello llevamos a cabo la secuenciación metagenómica de shotgun y de amplicones del ARNr 16S en muestras de un estudio de casos y controles español (n=136), que incluyó 57 casos con cáncer de páncreas, 50 controles y 29 pacientes con pancreatitis crónica en la fase de descubrimiento, y de un estudio de casos y controles alemán (n=76), en la fase de validación.

Los clasificadores metagenómicos fecales tuvieron un rendimiento mucho mejor que los basados en saliva e identificaron casos de cáncer de páncreas con una precisión de hasta AUROC=0,84 basándose en un conjunto de 27 especies microbianas, con una precisión estable tanto en estadios precoces como tardíos de la enfermedad. El rendimiento mejoró aún más hasta AUROC=0,94 AUROC cuando combinamos nuestras predicciones basadas en el microbioma con los niveles séricos del antígeno carbohidrato (CA) 19-9, el único biomarcador diagnóstico no invasivo de cáncer de páncreas, aprobado por la FDA y de baja especificidad. Además, un modelo de clasificación restringido a especies enriquecidas en cáncer de páncreas fue altamente específico de la enfermedad cuando se validó contra 25 poblaciones con estudio metagenómico disponibles públicamente para diversas afecciones de salud (N = 5792). Ambos modelos basados en el microbioma tuvieron una alta precisión de predicción en una población de validación alemana externa (N = 76). Varias especies de marcadores fecales fueron detectables en tejido pancreático tumoral (**Figura 1**) y no tumoral mediante secuenciación de ARNr 16S e hibridación in situ con fluorescencia.

En conjunto, nuestros resultados indicaron que es posible realizar un cribado no invasivo, robusto y específico basado en la microbiota fecal para la detección temprana del cáncer de páncreas.



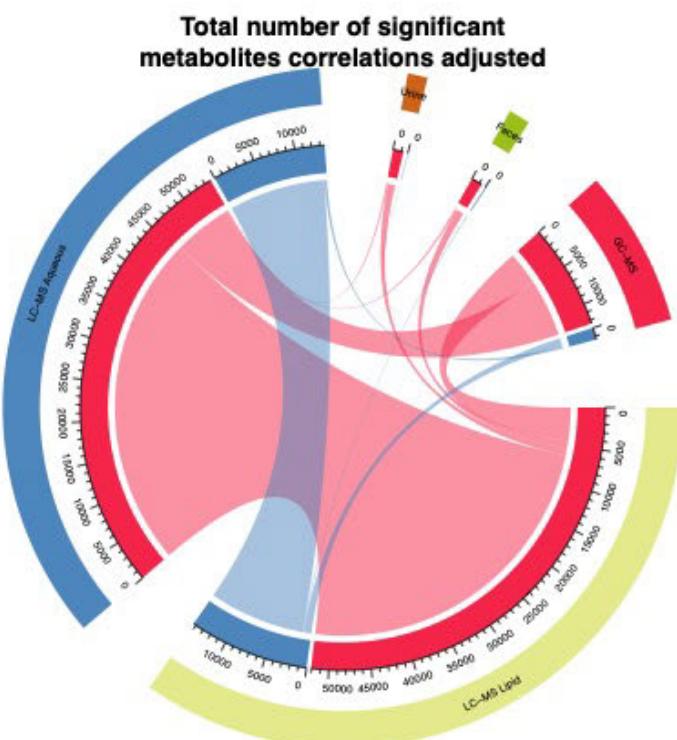
Artículo científico 2. Jurado F, et al. (en revisión en Gut)

Estudios preliminares han destacado el valor del metaboloma de biofluidos para predecir el riesgo de cáncer de páncreas por lo que, en este estudio quisimos identificar las características del metaboloma a partir de matrices multicapa (suero, heces, orina) asociadas con el riesgo de cáncer de páncreas y crear un modelo metabolómico integrador para definir la población de alto riesgo de cáncer de páncreas.

Para ello seleccionamos un subconjunto de la población del estudio PanGenEU en función de la disponibilidad de muestras de suero, orina y heces, compuesto por un total de 60 casos de cáncer de páncreas y 56 controles emparejados por edad, sexo y hospital. Los datos del metaboloma sérico se generaron mediante cromatografía líquida/gas-espectrometría de masas, y los de metabolómica de orina y heces mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear. Se ajustó una regresión LASSO para la selección de características y estimamos el rendimiento de los modelos de cada capa y del modelo integrador. El AUC, validado internamente, se utilizó para evaluar la capacidad predictiva.

Se observó una correlación importante entre metabolitos de las diferentes capas (**Figura 2**). Se seleccionaron 20 metabolitos en el modelo GC-MS ($AUC = 0,84$; $DE = 0,08$). Los modelos LC-MS lipídico y acuoso incluyeron seis metabolitos ($AUC = 0,79$; $DE = 0,08$) y 12 metabolitos ($AUC = 0,81$; $DE = 0,07$), respectivamente. El modelo fecal se compuso de hasta seis metabolitos ($AUC = 0,66$; $DE = 0,10$) y el modelo urinario, de ocho metabolitos ($AUC = 0,51$; $DE = 0,11$). El modelo integrativo de cinco ensayos, que combina todos los metabolitos mencionados, alcanzó un $AUC = 0,85$ ($DE = 0,08$).

Este es el primer estudio que compara y combina metabolitos de suero, heces y orina para predecir el riesgo de cáncer de páncreas. La capacidad predictiva del perfil derivado del ensayo GC-MS fue similar a la de la combinación de los otros ensayos, lo que indica su potencial traslacional para lograr rentabilidad y simplicidad.



Artículo científico 3. Jurado F, et al. (borrador final a punto de ser somegdo)

Se estima que el cáncer de páncreas se convertirá en el segundo tipo de cáncer más mortal para el año 2030. Diversos factores de riesgo, como la edad, la pancreatitis y el estilo de vida, aumentan el riesgo del cáncer de páncreas. Sin embargo, estos factores no son lo suficientemente eficaces como para implementar intervenciones preventivas. Estudios preliminares apuntan al papel del microbioma en el desarrollo del cáncer de páncreas. Por lo tanto, nuestro objetivo principal fue construir un modelo predictivo temprano de riesgo para cáncer de páncreas basado en la microbiota oral y fecal, además de incluir datos epidemiológicos para identificar una población de alto riesgo.

Se generaron datos de ARNr 16S de la población PanGenEU-Mic. En total, 454 sujetos proporcionaron muestras orales, además de una subpoblación de 117 sujetos que proporcionaron una segunda muestra fecal. Se ajustó un modelo de regresión bayesiana basado en Kernels (RKHS) para obtener la puntuación de riesgo integrada. Todos los análisis se corrigieron por sexo, edad, centro, grupo y diabetes. La sensibilidad (SEN), la precisión media (MA) y el área bajo la curva (AUC) fueron las estimaciones implementadas para las comparaciones.

Una validación cruzada interna de 10 veces k-folds arrojó una SEN = 0,57 y una MA = 0,57 para el microbioma oral, y una SEN = 0,57 y una MA = 0,67 para el microbioma fecal. El AUC basado en el microbioma fecal fue de 0,794, y la combinación de ambos microbiomas no la mejoró (AUC = 0,787). Al incluir la pancreatitis crónica en el grupo control, las tres estimaciones disminuyeron. La segregación de sujetos en cuartiles y el ajuste de los límites de decisión aumentaron la MA = 0,92 y la SEN = 0,84.

El microbioma fecal demostró superar la capacidad predictiva del microbioma oral y de la combinación de microbiomas.

Análisis preliminares sobre las correlaciones entre el microbioma y el metaboloma en el contexto del adenocarcinoma ductal pancreático.

El microbioma es un mosaico complejo de microbios que influyen en numerosos procesos corporales. Se ha vinculado a diferentes tipos de cáncer. Paralelamente, los metabolitos son generados por el microbioma y pueden influir en su composición. Se cree que esta red dinámica y multifacética de interacciones influye en el riesgo de cáncer. En este estudio pretendíamos dilucidar las asociaciones e interacciones entre comunidades microbianas específicas y los perfiles de metabolitos.

Se seleccionó a población PanGen-Mic en función de la disponibilidad de muestras orales, de sangre, orina y heces, con 44 casos de cáncer de páncreas y 38 controles hospitalarios. Todos los sujetos contaban con datos metabolómicos generados mediante ensayos de RMN para cuantificar la concentración de metabolitos en heces (25 metabolitos) y orina (25 metabolitos), y mediante cromatografía líquida/gas para cuantificar los metabolitos séricos (470-2000 metabolitos). Se procesaron muestras orales y fecales para extraer y secuenciar el 16S bacteriano (250 y 290 ASV, respectivamente).

Se evaluaron las asociaciones entre la abundancia de bacterias individuales y la cantidad de metabolitos individuales mediante modelos lineales ajustados (paquete GLM), con análisis de sensibilidad adicionales que incorporaron la diversidad alfa de Shannon para explorar el impacto de la ecología microbiana.

Las interconexiones más fuertes se observaron entre los metabolitos séricos lipídicos y acuosos, abarcando hasta el 80% de las características en ambos ensayos (58.711 asociaciones significativas). Solo se encontraron cuatro correlaciones significativas entre los metabolitos urinarios y fecales, lo que representa el 0,6% de todas las combinaciones analizadas. Las correlaciones positivas fueron más frecuentes que las negativas en todos los tipos de muestra. Cabe destacar que todas las asociaciones entre los microbiomas orales y fecales fueron positivas, lo que indica un aumento conjunto de especies distintas en la boca y el intestino. Los datos preliminares sugieren que la diversidad microbiana influye en las interacciones entre el microbioma y el metaboloma, lo que podría afectar el riesgo de cáncer en el huésped.

El papel del microbioma en el riesgo de cáncer ya no debe considerarse un factor lineal único. La intrincada red de interacciones entre el microbioma y el metaboloma requiere métodos computacionales sofisticados y una interpretación matizada para comprender plenamente sus implicaciones que estamos explorando actualmente.

Análisis preliminares sobre cambios en el viroma en el cáncer de páncreas: nuevos conocimientos de la metagenómica no dirigida.

La microbiota humana desempeña un papel crucial en la salud y la enfermedad, incluido el cáncer. Diversos estudios han descrito alteraciones de la microbiota intestinal y oral en el cáncer de páncreas, aunque la mayoría se ha centrado en bacterias, mientras que la fracción viral permanece en gran parte inexplorada. En este estudio, investigamos el viroma fecal y salival de pacientes con cáncer de páncreas.

Para ello, analizamos muestras de 43 pacientes con cáncer de páncreas, 11 con pancreatitis crónica y 41 controles hospitalarios mediante metagenómica shotgun. Tras el control de calidad y la eliminación de las lecturas del huésped y de las bacterias, se ensamblaron y “desreplicaron” los “contigs” virales mediante el pipeline ViPER. La taxonomía se asignó con DIAMOND, BLASTn y VirSorter2. Posteriormente, evaluamos las métricas de diversidad, el estilo de vida de los fagos, la abundancia de Crassvirales y las predicciones del huésped.

En muestras fecales, los pacientes con cáncer de páncreas mostraron una riqueza de fagos significativamente menor que los controles y los pacientes con pancreatitis crónica. La diversidad beta de las comunidades de fagos difirió entre el cáncer de páncreas y los grupos control y pancreatitis crónica. Varios fagos (p. ej., *Malgrandaviricetes*) mostraron una abundancia diferencial entre los grupos. Las muestras de cáncer de páncreas presentaron menos fagos lisogénicos y presencia de Crassvirales. Los fagos que se predijo que infectarían hospedadores bacterianos específicos difirieron entre los pacientes con cáncer de páncreas y los controles en múltiples niveles taxonómicos. En saliva, solo unos pocos fagos, y los fagos dirigidos a hospedadores bacterianos específicos, difirieron entre el cáncer de páncreas y los controles. Las lecturas virales eucariotas fueron consistentemente bajas tanto en muestras fecales como salivales.

Este estudio es uno de los primeros en perfilar el viroma fecal y salival en el cáncer de páncreas mediante metagenómica shotgun sin enriquecimiento viral. Nuestros hallazgos resaltan los cambios en el viroma en el PDAC, lo que justifica una mayor exploración de biomarcadores basados en fagos para el cáncer de páncreas.

En conjunto, haber tenido podido disponer de esta ayuda económica ha permitido consolidar una línea de investigación muy prometedora en el grupo. Ello ha permitido formar a un estudiante de doctorado, realizar contribuciones científicas relevantes en el campo del cáncer de páncreas y establecer colaboraciones con científicos de renombre a escala nacional e internacional.

Con todo ello nuestra valoración del impacto de la Beca C. Delgado y M Pérez-Mateo en el GMEG es de excelente lo que se añade al honor de haber sido galardonados con esta Beca. Agradecemos enormemente a ACANPAN y AESPANC el habernos concedido la mencionada ayuda.



Beca 2019 (Básica)

Eva C. Vaquero:

La Dra. Eva C. Vaquero Raya es especialista en Aparato Digestivo y doctora en Medicina por la Universidad de Barcelona. Trabaja en el Hospital Clínic de Barcelona, donde es referente en enfermedades pancreáticas.

Tras una estancia postdoctoral en Los Ángeles, se formó en investigación básica en modelos experimentales de pancreatitis y cáncer de páncreas. Compagina su labor clínica con la investigación traslacional en el grupo de Oncología Gastrointestinal y Pancreática del IDIBAPS, y es miembro del CIBEREHD.

Ha contribuido de forma destacada al estudio del papel de las células estrelladas pancreáticas y actualmente lidera una línea experimental centrada en nuevas dianas terapéuticas. Ha sido presidenta de la Societat Catalana de Pàncrees y cuenta con una extensa producción científica sobre patología pancreática y participación en guías clínicas y documentos de consenso sobre cáncer de páncreas y pancreatitis aguda y crónica.

TITULO:

Intervención farmacológica sobre el patrón fibroinflamatorio asociado al desarrollo de cáncer de páncreas.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Eva C. Vaquero

Equipo investigador: Lida Torrens, Verónica Villagrasa, Manuel Domínguez, Mario Corbacho, Cristina Fillat, Xavier Molero

Centro: Hospital Clínic - IDIBAPS - CIBEREHD

Objetivo: Frenar el cáncer de páncreas desde su origen: cómo controlar el entorno que lo favorece.

Resumen

Este proyecto explora una estrategia de prevención temprana del cáncer de páncreas, centrada en su entorno tumoral. Partimos de la hipótesis de que ciertas condiciones de riesgo -como la mutación en el gen *KRas* y una dieta rica en grasas- inducen una activación precoz de las células estrelladas pancreáticas (CEPs), que favorece la aparición de lesiones precursoras del cáncer.

Observamos que, en este contexto, las células acinares presentan una mayor predisposición a iniciar el proceso de metaplasia acino-ductal (MAD), un cambio de identidad celular considerado una etapa temprana en la transformación tumoral. Utilizando modelos de cáncer de páncreas en ratones genéticamente modificados y estudios con células aisladas y acinares, demostramos que dos fármacos antifibróticos (nintedanib y pirfenidona) son capaces de modular tanto el comportamiento del estroma como la propensión epitelial a desarrollar MAD. Estos hallazgos sugieren que intervenir en el microambiente tumoral desde sus fases iniciales podría ser una vía prometedora para frenar la progresión del cáncer de páncreas.

Antecedentes

Antes de que aparezcan las primeras células tumorales en el páncreas, ya se están produciendo cambios profundos en su entorno. El llamado estroma pancreático -un tejido compuesto por fibroblastos, células inmunes, vasos y matriz extracelular- no es un simple acompañante del cáncer, sino un actor activo en su desarrollo. Entre sus componentes, las células estrelladas pancreáticas (CEPs) tienen un papel central: en estado normal están inactivas, pero cuando se activan, secretan señales que promueven inflamación, remodelación tisular y crecimiento celular.

Este proceso de activación no es aleatorio. Se ha observado que mutaciones en el gen *KRas* —presentes con gran frecuencia en el cáncer de páncreas, pero también en ciertas condiciones como la pancreatitis crónica o incluso en personas sanas de edad avanzada— alteran el comportamiento de las células epiteliales pancreáticas. Estas, a su vez, pueden emitir señales que modulan el entorno estromal, promoviendo la activación de las CEPs. Por sí sola, la mutación en *KRas* rara vez es suficiente para causar un tumor. Sin embargo, factores añadidos como una dieta rica en grasas, el tabaquismo o procesos inflamatorios pueden actuar como “segundos golpes” que potencian su efecto oncogénico, creando un contexto favorable para la transformación tumoral.

En fases muy tempranas de este proceso, incluso antes de que exista un tumor visible, se producen fenómenos como la metaplasia acino-ductal (MAD), donde las células acinares del páncreas cambian su identidad hacia un fenotipo ductal. Esta transformación es, en parte, reversible. Sin embargo, si ocurre en un entorno alterado, con estroma activado y señales proinflamatorias, puede dar lugar a lesiones precancerosas que progresen hacia un cáncer invasivo.

Durante mucho tiempo se pensó que las CEPs formaban un grupo homogéneo, pero investigaciones recientes han demostrado que existen subtipos con funciones muy distintas: algunas favorecen la inflamación, otras contribuyen al depósito de matriz fibrótica, y otras pueden alterar la respuesta inmune. Esta heterogeneidad funcional abre nuevas posibilidades para intervenir en el estroma de manera más precisa, sin eliminar por completo sus funciones beneficiosas.

Este marco conceptual plantea una pregunta clave: ¿es posible actuar sobre el estroma en esta fase inicial, antes de que aparezca un tumor, y modificar el comportamiento de las CEPs para frenar el proceso? En este proyecto abordamos esta cuestión evaluando el efecto de dos fármacos antifibróticos —nintedanib y pirfenidona— ya utilizados en el tratamiento de la fibrosis pulmonar. Queríamos entender si estos medicamentos podían reducir la activación del estroma en un contexto de alto riesgo tumoral inducido por *KRas* y dieta obesogénica, y así bloquear los primeros pasos hacia el desarrollo del cáncer de páncreas.

Objetivos del proyecto

El objetivo general del proyecto fue evaluar si un tratamiento antifibrótico pueden ‘desactivar’ las células estrelladas pancreáticas (CEPs), ayudándolas a recuperar su estado inactivo y saludable, y si esta intervención puede frenar el desarrollo de lesiones precursoras del cáncer de páncreas.

Los objetivos específicos fueron

- Evaluar como factores asociados al desarrollo de cáncer de páncreas, como el oncogén *KRas* y la dieta obesogénica, promueven la activación de las células estrelladas del páncreas y la capacidad latente de las células acinares de iniciar el proceso de transformación ductal.

- Analizar en ratones determinados a desarrollar neoplasia de páncreas si el tratamiento con nintedanib y pirfenidona frena la pre-activación de las CEPs y el potencial pro-MAD de las células acinares.
- Comprobar, en modelos animales, si nintedanib y pirfenidona reducen la aparición y extensión de lesiones precursoras.

Diseño experimental y metodología

La Figura 1 resume el diseño experimental utilizado en este proyecto.

Modelo de cáncer pancreático en ratón (in vivo)

Trabajamos con un modelo murino que reproduce condiciones de alto riesgo de cáncer pancreático, combinando dos factores:

1. Una mutación en el gen *KRas* (muy común en el cáncer de páncreas) expresada específicamente en las células del epitelio pancreático,
2. Una dieta rica en grasas (obesogénica, con un 50% de contenido lipídico), que favorece la inflamación y acelera el desarrollo neoplásico en el páncreas en presencia del oncogén *KRas*.

A estos ratones alimentados con dieta obesogénica les administramos pirfenidona o nintedanib por vía oral, mezclado con la dieta, hasta la semana 26 de vida.

Experimentos con células de ratón en cultivo (in vitro)

Las células estrelladas pancreáticas (CEPs) y las células acinares fueron aisladas de ratones con o sin mutación en *KRas*, alimentados con dieta normal o dieta obesogénica.

Algunos grupos de ratones recibieron tratamiento con nintedanib o pirfenidona hasta las 26 semanas de vida. Las CEPs se cultivaron durante 7-14 días para inducir su activación, y se analizó su expresión génica mediante RT-qPCR para genes representativos de subtipos activados (miofibroblástico, inflamatorio, presentador de antígeno e inmunosupresor). También se evaluó su capacidad proliferativa.

Para cuantificar la formación de estructuras MAD a partir de células acinares, utilizamos cultivos tridimensionales en Matrigel. Se aislaron las células acinares de los diferentes grupos de ratones y se cultivaron en estas condiciones. A los 4 días se contaron las estructuras ductales como medida de transformación hacia MAD.

Experimentos in vivo

Los páncreas de los diferentes grupos experimentales se tiñeron con hematoxilina y eosina y se valoró la extensión de las lesiones precursoras (MAD y PanIN) mediante inspección microscópica y cuantificación con el software QPath.

Resultados

1. Reprogramar el estroma: ¿es posible desactivar las células estrelladas?

Las células estrelladas pancreáticas (CEPs) se activan más en condiciones de alto riesgo tumoral (gen *KRas* mutado + dieta obesogénica), mostrando un perfil de activación -inflamatorio, miofibroblástico e inmunomodulador- y proliferativo muy acusado en comparación a las células de ratones sin mutación en *KRas* y aquéllos con dieta normal.

El tratamiento de los ratones con los fármacos antifibróticos nintedanib y pirfenidona da lugar a CEPs con un perfil menos activado y menos diversificado transcripcionalmente, así como con menor capacidad proliferativa, acercándolas de nuevo a un estado quiescente o inactivo. Podría decirse que los tratamientos antifibrogénicos utilizados amortiguan el estado de pre-activación latente de las CEPs originadas en un páncreas de riesgo (mutación en *KRas* y dieta obesogénica) (Figura 2).

2. Las primeras señales de alarma: cómo se activan los cambios celulares iniciales

Una de las primeras transformaciones que pueden llevar al cáncer de páncreas es la llamada metaplasia acino-ductal (MAD). Se trata de un cambio en el que las células encargadas de producir enzimas digestivas (células acinares) adoptan la forma y comportamiento de las células de los conductos pancreáticos. Aunque este cambio puede ser reversible, como por ejemplo después de una pancreatitis aguda, en condiciones desfavorables puede ser el primer paso hacia una lesión precancerosa. Es de destacar que la MAD se puede inducir de manera experimental *in vitro* en células acinares con mutación en *KRas*, pero no llega a establecerse cuando se utilizan células acinares no mutadas.

Utilizamos un sistema de cultivo tridimensional (3D) para estudiar cómo las células acinares pancreáticas desarrollan metaplasia acino-ductal (MAD) en diferentes condiciones. Por un lado, observamos que las células acinares aisladas de ratones con mutación en *KRas* formaban más estructuras tipo MAD si los animales habían sido alimentados con una dieta obesogénica, en comparación con los alimentados con dieta normal. Esto indica que ciertos factores internos, como la mutación oncogénica en *KRas* y la dieta, aumentan la capacidad de estas células para iniciar espontáneamente este cambio celular.

Por otro lado, al cultivar células acinares en presencia de “medio condicionado”—es decir, el líquido donde previamente se habían mantenido células estrelladas pancreáticas (CEPs) activadas—también vimos un aumento en la formación de estructuras MAD, en comparación con las células expuestas a un medio control. Esto sugiere que las señales químicas secretadas por las CEPs activadas pueden inducir este cambio desde el entorno.

En conjunto, estos resultados indican que la MAD puede producirse tanto de forma **autónoma** (por alteraciones en las propias células acinares) como **no autónoma** (por influencia del entorno estromal).

Un hallazgo especialmente relevante fue que el tratamiento de los ratones con los fármacos antifibróticos nintedanib y pirfenidona redujo la MAD autónoma en células acinares con *KRas* mutado. En otras palabras, estos fármacos actuaron como un “freno” ante los primeros pasos del proceso tumoral.

3. ¿Qué pasa en todo el páncreas? Estudios en modelos animales

Finalmente, evaluamos si los efectos observados a nivel celular se traducían en beneficios a nivel del órgano completo. Para ello, analizamos los páncreas de ratones con mutación en *KRas* alimentados con dieta rica en grasas, modelo que reproduce un entorno propicio para la progresión tumoral. Estos ratones fueron tratados con nintedanib o pirfenidona hasta las 26 semanas de vida.

Observamos que, si bien los tratamientos no impidieron la formación de lesiones, sí lograron reducir el área del órgano afectada por lesiones precursoras como MAD o MAD-PanIN (ver Figura 4). El análisis se realizó en ratones de 26 semanas, cuando aún no han desarrollado cáncer invasivo. Esto se debe a que nuestro enfoque se centró en intervenir durante la fase inicial de la carcinogénesis. Dado que el cáncer pancreático es una enfermedad particularmente agresiva y resistente, es probable que su prevención o tratamiento eficaz requiera combinar estos fármacos antifibróticos con terapias dirigidas contra el tumor en fases más avanzadas.

Esto indica que nintedanib y pirfenidona tienen capacidad para frenar el crecimiento de las lesiones iniciales. Este efecto podría ser relevante para enlentecer la progresión tumoral en contextos de alto riesgo, como el que combina predisposición genética (*KRas*) y dieta obesogénica.

Conclusión / Reflexiones finales

Los resultados de este proyecto demuestran que los fibroblastos del microambiente pancreático pueden ser intervenidos desde fases muy tempranas, antes de que aparezcan lesiones tumorales evidentes. Asimismo, hemos descrito como una dieta obesogénica, en presencia de un oncogén propicio y casi universal en el cáncer de páncreas, como es *KRas*, otorga a las células acinares una particular facilidad para transformarse en células ductales y comenzar así el camino hacia el cáncer.

Hemos demostrado también que es posible modular el comportamiento de las células estrelladas pancreáticas y de las células acinares con fármacos antifibróticos ya aprobados para otras patologías, y que este enfoque puede frenar la progresión de los cambios celulares iniciales asociados al cáncer de páncreas.

Es posible que se cuestione la utilidad de intervenir en estadios pre-malignos, cuando aún no existe un tumor definido. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que el entorno tumoral empieza a modificarse mucho antes de la aparición del cáncer, y que estas alteraciones iniciales son clave para su posterior desarrollo. Actuar en estas fases tempranas no sustituye el tratamiento del cáncer avanzado, pero puede convertirse en una estrategia complementaria para retrasar —o incluso impedir— su aparición en contextos de alto riesgo, como el cáncer de páncreas hereditario, la pancreatitis crónica, la obesidad o el tabaquismo.

Estos hallazgos abren nuevas vías de investigación orientadas a la prevención del cáncer desde su origen, interviniendo no sobre el tumor en sí, sino sobre el terreno que lo favorece. Futuros estudios podrán explorar combinaciones terapéuticas, dosis óptimas y posibles beneficios clínicos en etapas más avanzadas de la enfermedad.

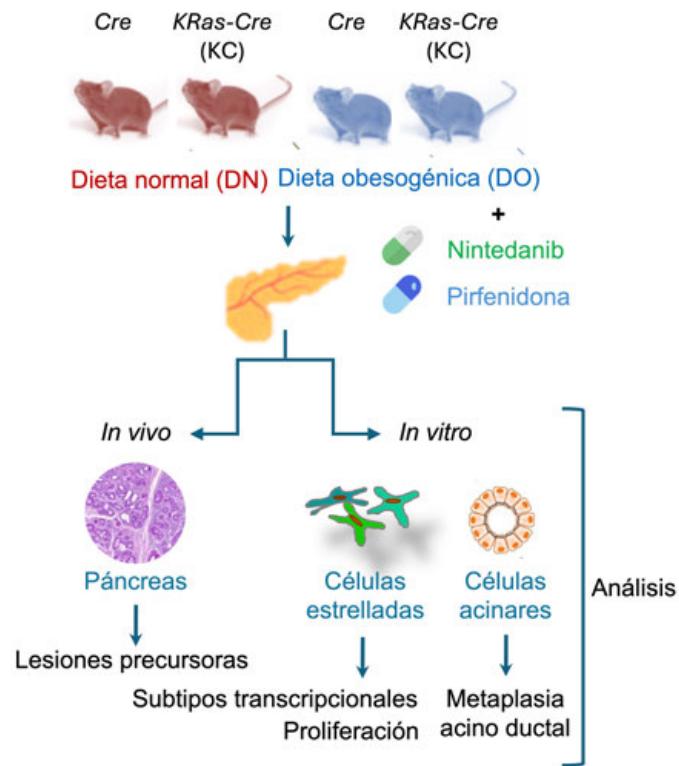


Figura 1. Diseño experimental del estudio

Se utilizaron ratones con mutación en *KRas* alimentados con dieta rica en grasas para inducir un entorno de alto riesgo tumoral. Se evaluó el efecto de los fármacos antifibróticos nintedanib y pirfenidona sobre la activación del estroma, la metaplasia acino-ductal y la formación de lesiones precursoras del cáncer de páncreas.

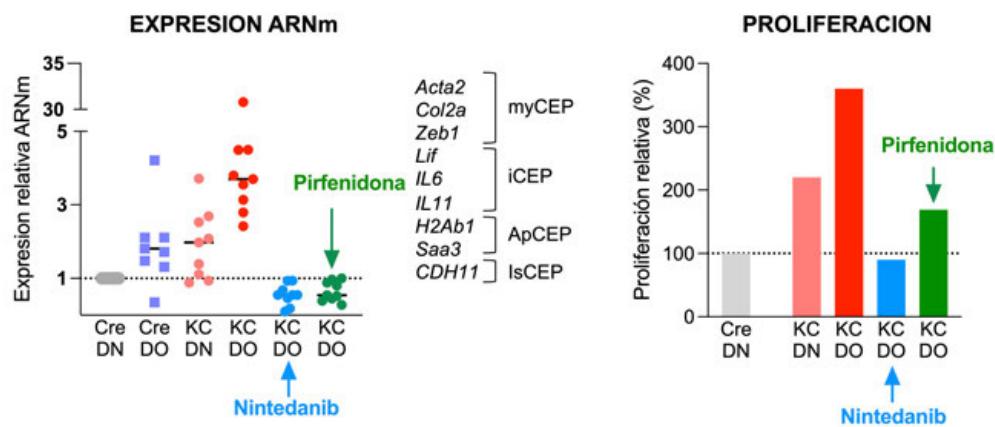


Figura 2. Activación de las células estrelladas pancreáticas

Las células estrelladas se activan intensamente en condiciones de alto riesgo tumoral (*KRas* + dieta obesogénica rica en grasas). Los fármacos nintedanib y pirfenidona reducen esta activación y su capacidad de proliferar.

Subtipos de CEPs evaluados:

- myCEP: perfil miofibroblástico (productor de matriz).
- iCEP: perfil inflamatorio (productor de citoquinas).
- ApCEP: perfil presentador de antígeno (modulador inmune).
- IsCEP: perfil inmunosupresor (sugiere interacción con células inmunes tolerogénicas).

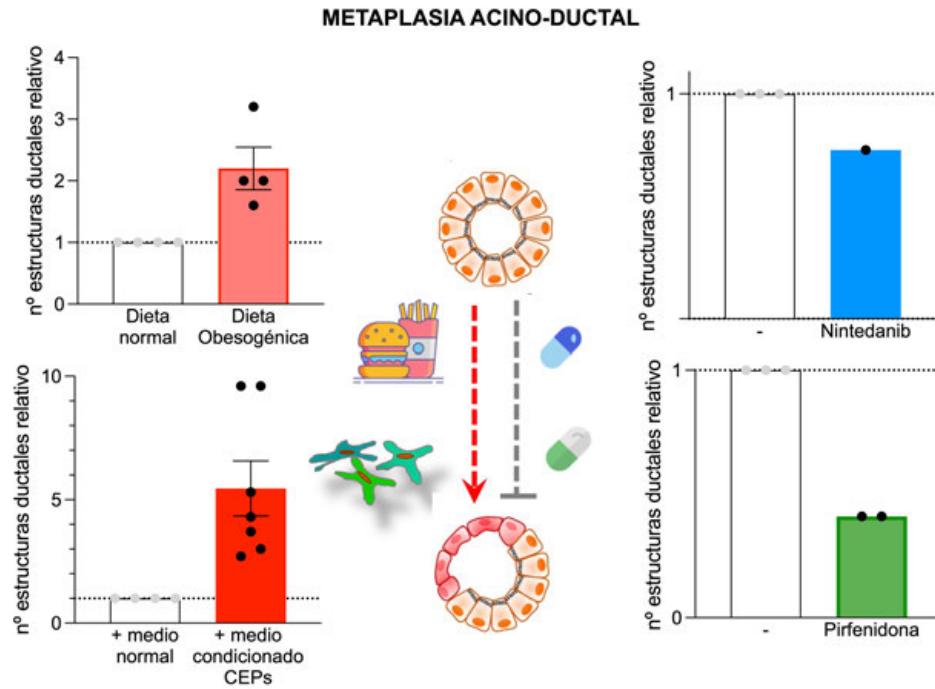


Figura 3. Evaluación in vitro de la formación de MAD a partir de células acinares de ratones con mutación en *KRas*.

Se analizó cómo distintos contextos modifican la capacidad de las células acinares para formar estructuras MAD en cultivo tridimensional:

- Dieta obesogénica: las células de ratones alimentados con dieta rica en grasas formaron más MAD.
- Estimulación con medio condicionado de células estrelladas activadas: incrementó aún más la formación de MAD.
- Tratamiento de los ratones con nintedanib o pirfenidona: redujo la capacidad de las células acinares para formar MAD.

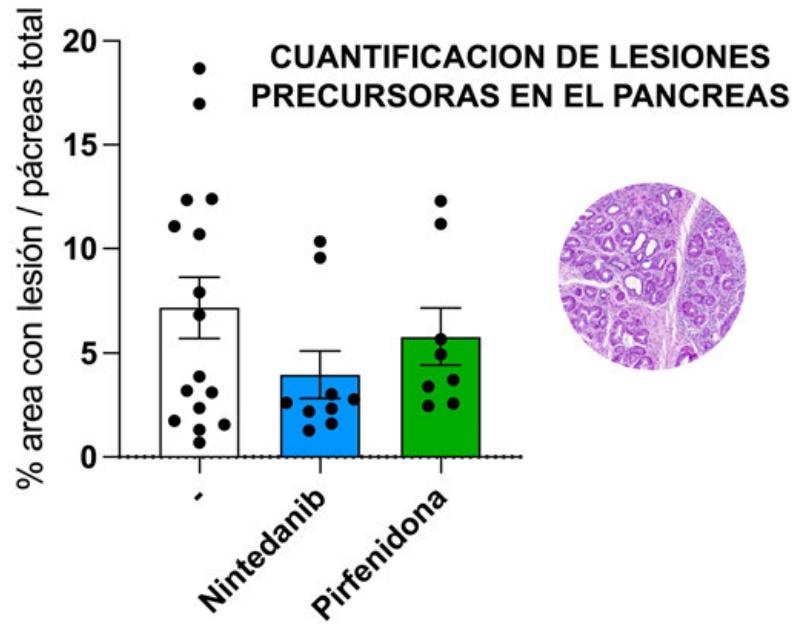


Figura 4. Reducción de lesiones precursoras tras el tratamiento con nintedanib y pirfenidona.

En modelos animales con alto riesgo de desarrollar cáncer de páncreas, el tratamiento con nintedanib o pirfenidona reduce el área del tejido pancreático ocupada por lesiones iniciales, como la metaplasia acino-ductal (MAD) y las lesiones MAD-PanIN.



Beca 2019 (Clínica)

Alfredo Carrato:

Alfredo Carrato es actualmente Chair of Pancreatic Cancer Europe – PCE, con sede en Bruselas, Investigador en cáncer de páncreas del Grupo BIOPAC del IRYCIS, Catedrático Emérito de la Universidad Alcalá, Director de Relaciones Internacionales de la Fundación ECO y Asesor del grupo Biliopancreático del TTD.

Ha sido Catedrático y Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Ramón y Cajal y de la Universidad de Alcalá (2008-2021).

Presidente de la Comisión Nacional de Oncología Médica (2003-2014), de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (2005-2007), de la Sociedad Española de Investigación en Cáncer (ASEICA) y de la FESEO (2013- 2015).

Director del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (2015-2019). Miembro del Comité Ejecutivo del Grupo TTD (1992-2024).

TITULO:

Programa de aproximación a la detección precoz del cáncer de páncreas exocrino en población general de mayor riesgo, definida por criterios clínico- epidemiológicos, mediante nuevos biomarcadores en biopsia líquida y técnicas de imagen.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Alfredo Carrato Mena

Centro de realizacion: Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

Financiacion: El proyecto fue premiado con 77.000 € en la Categoría Clínica en la convocatoria de 2019.

Introducción

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es el tipo más común de cáncer pancreático y representa el 90% de los casos. El impacto de este cáncer en la salud pública es grande, actualmente, es la cuarta causa principal de muerte por cáncer y se espera que, para el año 2030, se convierta en la segunda causa de muerte por cáncer, superando a otros tipos más comunes como el de mama, próstata o colorrectal, debido a su diagnóstico tardío y la falta de opciones efectivas de tratamiento cuando se detecta en etapas avanzadas.

Uno de los mayores retos es nuestra incapacidad para detectarlo en una etapa temprana, cuando es más tratable y potencialmente curable. La detección precoz en personas con mayor riesgo de desarrollar este cáncer podría aumentar la tasa de supervivencia a 5 años hasta un 30–40%. Programas de cribado de cáncer pancreático mediante técnicas de imagen es recomendado para personas con un riesgo estimado de vida superior al 5-10%, lo que incluye a los siguientes grupos:

- 1)** Personas que tienen mutaciones genéticas hereditarias asociadas a un mayor riesgo de desarrollar cáncer pancreático
- 2)** Personas con dos o más familiares de primer grado afectados por cáncer pancreático, sin una mutación genética conocida
- 3)** Personas con lesiones precursoras de cáncer pancreático, como las neoplasias quísticas mucinosas o las neoplasias intraductales papilares mucinosas (IPMN).

El Grupo de investigación multidisciplinar dirigido por el Dr. Alfredo Carrato en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) y el Hospital Ramón y Cajal, puso en marcha en 2009 un registro de familias con cáncer de páncreas familiar y un programa de cribado para la detección precoz para individuos de alto riesgo.

Biomarcadores sensibles y precisos que complementan el programa de cribado actual basado en imagen son clave para mejorar los programas de cribado y detectar el cáncer en una etapa curable (T1N0M0). Este proyecto buscaba mejorar el cribado en familiares de pacientes con cáncer de páncreas mediante nuevas técnicas de imagen y biomarcadores, y evaluar su rentabilidad al aplicarlo también a personas con riesgo elevado de cáncer de páncreas por factores como pancreatitis, diabetes, tabaquismo, alcoholismo u obesidad.

Objetivos generales del proyecto:

- 1) La mejora del programa de cribado existente en familiares sanos de cáncer de páncreas familiar mediante nuevos programas de imagen (radiómica) y nuevos biomarcadores
- 2) Constatar la rentabilidad de implementar un programa de cribado, mediante los biomarcadores y pruebas de imagen que utilizamos en cáncer familiar, en la población general con mayor riesgo de sufrir un cáncer de páncreas esporádico con factores de riesgo conocidos como pancreatitis previa o diabetes mellitus más, al menos, un factor de riesgo como el hábito tabáquico, alcoholístico y la obesidad.

Resumen del progreso y cumplimiento de los distintos objetivos:

Objetivo 1)

Completar la cohorte de individuos sanos con factores clínico-epidemiológicos de riesgo (Diabetes Mellitus, Pancreatitis anteriores, consumo de tabaco y alcohol, sobrepeso), a los que se realizarán las mismas pruebas de imagen y toma de muestra sanguínea para análisis bioquímicos (Glucemia, HbA1c, CA 19.9) y moleculares que a la cohorte retrospectiva ya disponible, así como sus datos clínicos y epidemiológicos:

La base de datos actual incluye 217 casos diagnosticados con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) y 213 individuos de alto riesgo (HRI), que son familiares de primer y segundo grado participando en un programa de cribado para la detección precoz de PDAC. Hay un conjunto mínimo de 62 variables para todos los pacientes y individuos de alto riesgo (Tabla 1). Las variables recogidas incluyen, entre otras:

- Datos demográficos (edad, sexo)
- Datos epidemiológicos (tabaquismo, pancreatitis, diabetes, sobrepeso, antecedentes familiares de cáncer)
- Datos clínicos, histológicos y de seguimiento (diagnóstico SNOMED, estadio, ECOG, tipos de tratamiento, glucosa en ayunas, HbA1c, pérdida de peso, síntomas)
Las características de imagen, síntomas y hábitos tóxicos de los individuos de alto riesgo se recopilan anualmente mediante un breve cuestionario diseñado en el marco de PANGENFAM y PRECEDE.

Tipo de dato	Variable	% Completitud de Datos (n.º de variables)
Molecular	NGS somático y germinal (positivo/negativo, tipo de variante)	77 (4)
Imagen	Características de primer orden de radiómica (heterogeneidad, forma, asimetría, energía y entropía) EUS y RM (6 características de alto riesgo)	74 (18)
Demográfico	Fecha de nacimiento, sexo, raza, categoría de cohorte	90 (4)
Hábitos tóxicos	Tabaco, alcohol (sí/no, frecuencia, tipo)	82 (4)
Epidemiológico	Diabetes, pancreatitis, antecedentes familiares de cáncer, otras enfermedades relevantes	82 (4)
Clínico	Fecha de diagnóstico, tipo histológico, localización, estadio, TNM, ECOG (Dx), edad (Dx), tratamiento, estado actual, supervivencia	70 (10)
Análisis sanguíneo rutinario	Bilirrubina, HbA1c, Glucosa en ayunas, CA19-9, CEA, GGT, GOT, GPT	88 (8)

Tabla 1: La base de datos está compuesto por 430 individuos (217 casos de PDAC y 213 individuos de alto riesgo en cribado), con un mínimo de 62 variables distribuidas en 8 tipos de datos multimodales.

Objetivo 2) Análisis de las pruebas de imagen TAC y RNM mediante un software especializado que permitirá no sólo el análisis de tamaño y el aspecto de la lesión, sino también el porcentaje de estroma y la organización celular específica del mismo.

La estructura y formato de informes de imágenes por endoscopia y Resonancia magnética sigue las recomendaciones actuales de las guías internacionales, utilizando una plantilla estandarizada que permite registrar la calidad de la imagen, las características del parénquima pancreático y del conducto pancreático principal, la presencia de quistes pancreáticos, lesiones sólidas, anomalías peripancreáticas y la necesidad de realizar biopsia en caso de hallazgos relevantes. Las plantillas de informe de EUS ya están integradas en la historia clínica electrónica de la unidad de alto riesgo pancreático del Servicio de Gastroenterología, ya que deben completarse durante el procedimiento. Por otro lado, el análisis de imágenes por RM puede realizarse posteriormente.

Los datos de imagen longitudinales de los individuos de alto riesgo se han analizado mediante el software Quibim® (**Figura 2a y 2b**). Las características de primer orden se obtuvieron a partir de histogramas, mientras que las de segundo orden se basaron en la distribución de intensidades en una matriz tridimensional (**Figura 2c**).

Figura 2a. Tejido pancreático de un sujeto sano en vista axial

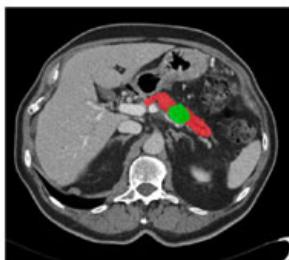


Figura 2b. Tejido pancreático de un paciente con PDAC en vista axial

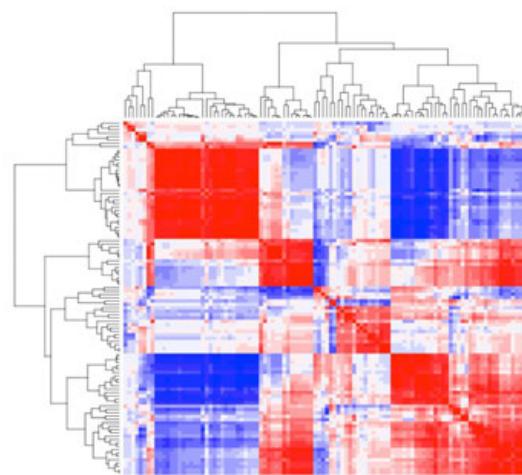


Figura 2c. Matriz de correlación para cada combinación de variable

Objetivo 3) Determinación de la presencia de mutaciones en DNA libre tumoral en suero y en línea germinal conocidas por su asociación con el cáncer de páncreas.

Se realizó secuenciación dirigida de un panel de 66 genes relacionados con síndromes de cáncer hereditario en una cohorte de 151 individuos pertenecientes a 81 familias diferentes: 57 casos de cáncer de páncreas familiar (FPC), 49 casos esporádicos (SPC) y 45 individuos de alto riesgo (HRI) con antecedentes familiares significativos de PDAC u otros síndromes de cáncer hereditario que confieren riesgo de PDAC, pero sin muestra de ADN germinal disponible de un paciente con PDAC dentro de la familia.

Se identificaron variantes candidatas que podrían predisponer al desarrollo de cáncer de páncreas en el 24,56 % de los casos con antecedentes familiares sugerentes de base hereditaria, siendo la mayoría con fenotipo FPC. Sin embargo, una proporción importante de casos FPC no presentó variantes con potencial causal.

En cuanto a los casos esporádicos, un alto porcentaje (85,71 %) no presentaba variantes candidatas, aunque se detectaron algunas variantes de riesgo (14,28 %), principalmente en los genes ATM y MUTYH.

Cerca del 50 % de los individuos de alto riesgo (HRI) presentaron variantes candidatas de interés, algunos de los cuales mostraban anomalías pancreáticas en el cribado consideradas como precursores de PDAC, como IPMN, mientras que otros presentaban hallazgos de bajo riesgo o ninguna alteración detectada por imagen (**Figura 3a**).

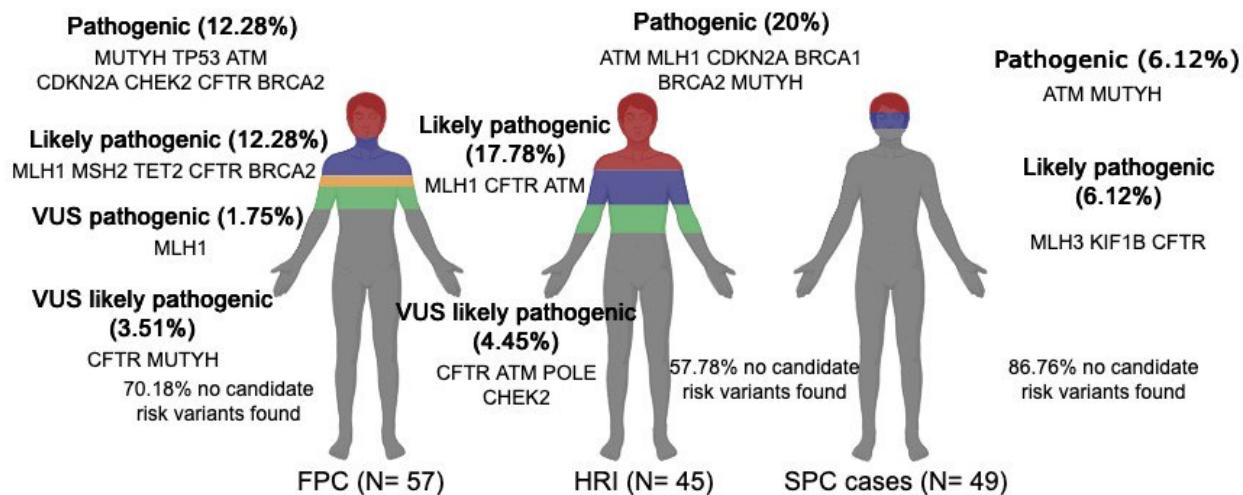


Figura 3a: Prevalencia de variantes genéticas en cohortes familiares, esporádicas y de alto riesgo de cáncer de páncreas

Se analizaron 134 muestras de plasma para valorar en cfDNA el estatus de la mutación de KRAS G12D, G12R y G12V, dividiendo la misma en cuatro grupos: KRAS mutado (M+), nativo o wild-type (WT), indeterminado (UND) y borderline (BL). 14 pacientes/muestras fueron censuradas por motivos diversos, fundamentalmente por no haber alcanzado el evento en el momento del análisis o por pérdida de seguimiento. 86 casos fueron nativos y 20 mutados para G12D. No se detectaron mutaciones para G12R y G12V. 26 casos fueron indeterminados y 18 fueron border-line mutados (4 para G12V, 11 para G12R y 3 para G12D). Se realizó el análisis considerando únicamente los casos con estatus claramente definido, es decir, mutado (M+) y nativo (WT). Esta clasificación permitió una comparación más precisa entre ambos subgrupos, aumentando la fiabilidad de las asociaciones observadas y reduciendo la posibilidad de errores de clasificación que pudieran afectar la interpretación de los resultados.

La mediana de supervivencia fue de 201,5 días en el grupo M+ y de 476 días en el grupo WT, con un cociente de medianas de 0,42 (IC 95%: 0,25–0,71). El test de log-rank (Mantel-Cox) evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2 = 11,60$, $p = 0,0007$), al igual que el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon ($\chi^2 = 9,62$, $p = 0,0019$), lo que sugiere una diferencia consistente tanto a lo largo del tiempo como en los eventos tempranos, mientras que la hazard ratio (HR) para el test Mantel-Haenszel, fue de 3,47 (IC 95%: 1,70–7,10), indicando un riesgo de muerte más de tres veces mayor en los pacientes con mutación de KRAS. (**Figura 3b**).

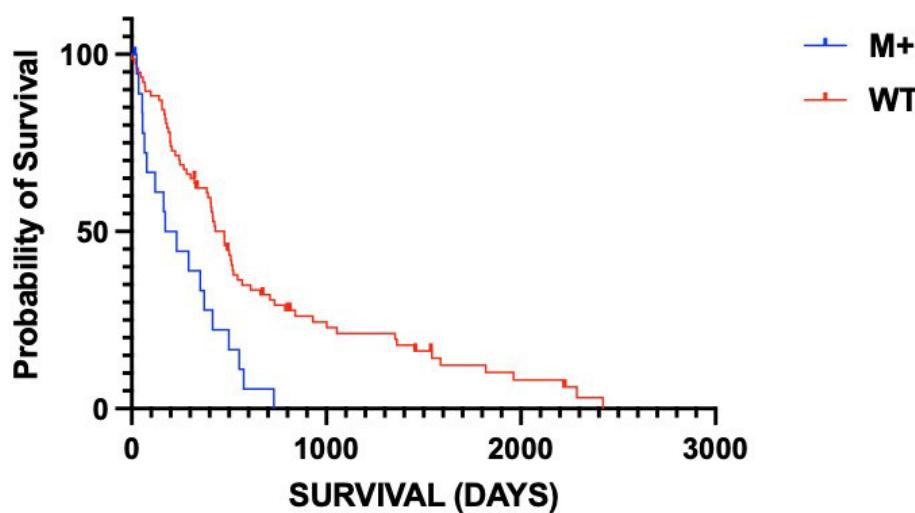


Figura 3b: La detección de KRAS mutado en cfDNA de plasma tiene valor pronostico, pacientes positivos para KRAS mutado en plasma al diagnóstico tiene una menor supervivencia global frente los pacientes negativos.

Objetivo 4) Caracterizar la composición en RNAs no codificantes circulantes en suero de pacientes. Determinación de niveles de miRNAs en suero previamente asociados al desarrollo y progresión del cáncer de páncreas.

Se analizó el perfil de expresión de 31 miARN en cuatro cohortes: individuos sanos, casos de cáncer, personas con riesgo genético y personas con riesgo ambiental. Identificamos miRNA individuales y en combinaciones que permiten diferenciar entre casos y controles sanos, lo que muestra un gran potencial como biomarcador diagnóstico (**Figura 4**). Además, hemos identificado varios miARN individuales y en combinación que permiten distinguir entre casos con antecedentes familiares y no familiares, así como entre individuos de alto riesgo en seguimiento con y sin lesiones precursoras de adenocarcinoma ductal pancreático.

Estos biomarcadores, junto con otros marcadores circulantes, datos demográficos, epidemiológicos y radiómicos, serán analizados en un conjunto de datos amplio y robusto que incluye más de 200 casos e individuos de alto riesgo, utilizando métodos de aprendizaje automático. El objetivo es identificar un panel diagnóstico multimodal para su posterior validación en cohortes externas longitudinales con muestras obtenidas antes del diagnóstico.

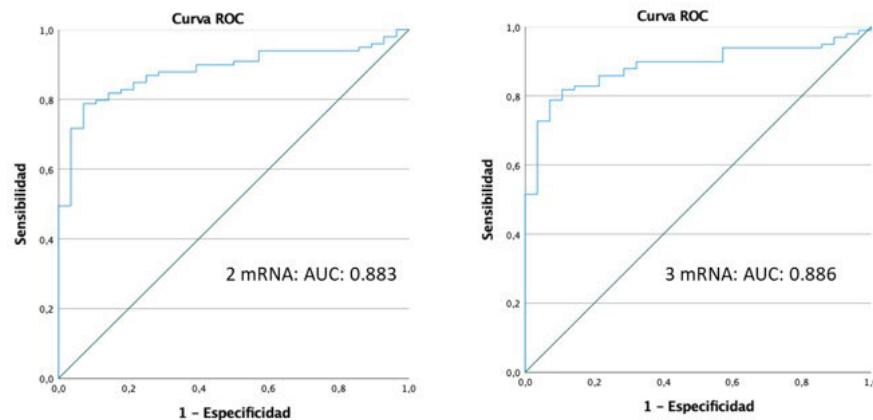


Figura 4: Curvas ROC combinadas que demuestran la capacidad discriminativa de diferentes combinaciones de miARN para distinguir entre casos de cáncer de páncreas e individuos sanos

Objetivo 5) Integración de toda esta información en un análisis multivariable para la creación de un modelo estadístico con valor predictivo de desarrollo de cáncer de páncreas, que permita identificar la población de alto riesgo sobre la que efectuar el cribado y que será validado en futuros proyectos.

Se realizó un análisis para el desarrollo de un modelo diagnóstico utilizando los niveles circulantes de 9 proteínas en una cohorte de 205 individuos (100 casos de cáncer de páncreas, 75 individuos de alto riesgo y 30 controles sanos). Para garantizar la calidad de los datos, se eliminaron muestras con valores perdidos y se segmentó el conjunto de datos, enfocándose en identificar un conjunto mínimo de variables relevantes para clasificar las muestras mediante un modelo estable y generalizable, teniendo en cuenta el tamaño muestral.

Los datos se dividieron en 70 % para entrenamiento y 30 % para validación. Se desarrollaron y ajustaron modelos de clasificación mediante Random Forest y árboles de decisión, optimizando parámetros como la profundidad máxima para evitar el sobreajuste. Para la selección de variables, se aplicó regresión logística con penalización L1 sobre 100 muestras bootstrap, seleccionando aquellas variables con mayor frecuencia de coeficientes distintos de cero. La penalización L1 permitió reducir biomarcadores correlacionados, fomentando la esparsidad del modelo.

El rendimiento del modelo se evaluó mediante validación cruzada leave-one-out y AUC (área bajo la curva). El modelo final basado en datos proteómicos alcanzó una precisión del 75 %, lo que demuestra el potencial del conjunto de datos para el desarrollo de herramientas diagnósticas efectivas.

No obstante, este análisis también puso de manifiesto limitaciones actuales, principalmente la falta de datos completos, lo que afecta la solidez de los resultados. Estas limitaciones se abordarán buscando financiación adicional para ampliar los análisis moleculares y radiómicos, lo que permitirá desarrollar modelos más robustos apoyados en datos de alta calidad ya generados.

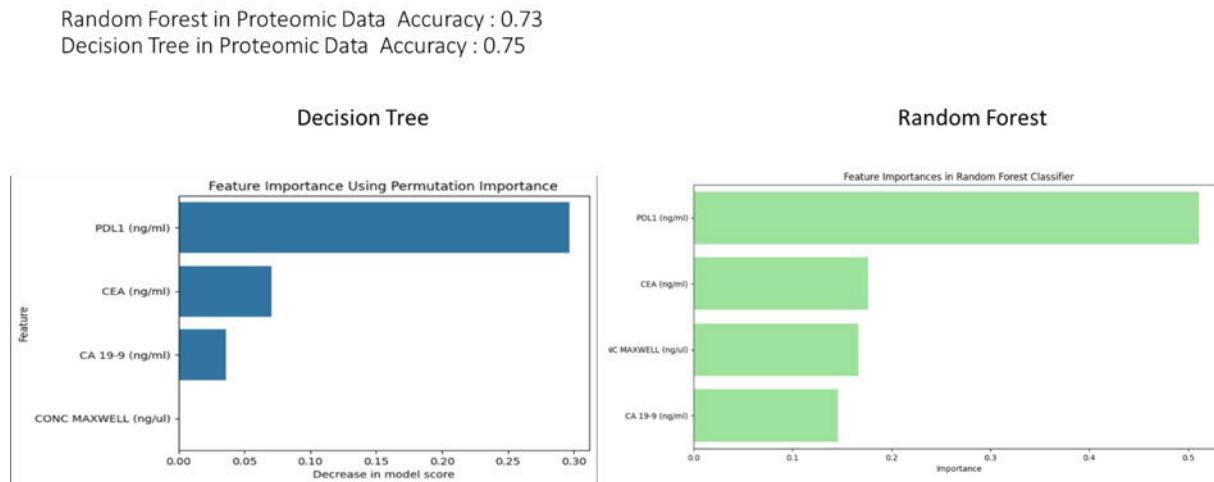


Figura 5: Desarrollo de un modelo diagnóstico basado en biomarcadores proteicos circulantes en cáncer de páncreas.

Hitos hasta la fecha relacionado con el proyecto de la línea de investigación:

Publicaciones:

- Earl J, Barreto E, Castillo ME, Fuentes R, Rodríguez-Garrote M, Ferreiro R, Reguera P, Muñoz G, García-Seisdedos D, López JV, Sainz B Jr, Malats N, Carrato A. Somatic Mutation Profiling in the Liquid Biopsy and Clinical Analysis of Hereditary and Familial Pancreatic Cancer Cases Reveals KRAS Negativity and a Longer Overall Survival. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 31;13(7):1612. PMID: 38753287.
- Earl J, Fuentes R, Sanchez MEC, de Paredes AGG, Muñoz M, Sanjuanbenito A, Lobo E, Caminoa A, Rodríguez M, Barreto E, López JV, Ruz-Caracuel I, Durán SL, Olcina JRF, Sánchez BL, Páez SC, Torres A, Blázquez J, Sequeros EV, Carrato A. The Spanish Familial Pancreatic Cancer Registry (PANGENFAM): a decade follow-up of individuals at high-risk for pancreatic cancer. *Familial cancer*. 2024. PMID: 38753287.
- Cristina-Marianini-Rios, Sanchez MEC, de Paredes AGG, Rodríguez M, Barreto E, López JV, Fuentes R, Beltrán MM, Sanjuanbenito A, Lobo E, Caminoa A, Ruz-Caracuel I, Durán SL, Olcina JRF, Blázquez J, Sequeros EV, Carrato A, Ávila JCM, Earl J. The best linear unbiased prediction (BLUP) method as a tool to estimate the lifetime risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in HRI with no known pathogenic germline variants. *Familial cancer*. 2024. PMID: 38780705.

4. Zogopoulos G, Haimi I, Sanoba SA, Everett JN, Wang Y, Katona BW, Farrell JJ, Grossberg AJ, Paiella S, Klute KA, Bi Y, Wallace MB, Kwon RS, Stoffel EM, Wadlow RC, Sussman DA, Merchant NB, Permuth JB, Golan T, Raitses-Gurevich M, Lowy AM, Liau J, Jeter JM, Lindberg JM, Chung DC, Earl J, Brentnall TA, Schrader KA, Kaul V, Huang C, Chandarana H, Smerdon C, Graff JJ, Kastrinos F, Kupfer SS, Lucas AL, Sears RC, Brand RE, Parmigiani G, Simeone DM; PRECEDE Consortium. The Pancreatic Cancer Early Detection (PRECEDE) Study is a Global Effort to Drive Early Detection: Baseline Imaging Findings in HRI. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2024. PMID: 38626807.
5. Overbeek KA, Goggins MG, Dbouk M, Levink IJM, Koopmann BDM, Chuidian M, Konings ICAW, Paiella S, Earl J, Fockens P, Gress TM, Ausems MGEM, Poley JW, Thosani NC, Half E, Lachter J, Stoffel EM, Kwon RS, Stoita A, Kastrinos F, Lucas AL, Syngal S, Brand RE, Chak A, Carrato A, Vleggaar FP, Bartsch DK, van Hooft JE, Cahen DL, Canto MI, Bruno MJ. Timeline of development of pancreatic cancer and implications for successful early detection in HRI. *Gastroenterology*. 2022. PMID: 34678218.

Financiación competitiva:

1. Una aproximación multiómica al cáncer de páncreas familiar para su diagnóstico precoz y tumorigénesis basada en genoma, metiloma, microbioma y radiómica (PI22/00583). Acción Estratégica en Salud (AES) ISCIII 2022; PI22/0583. PI: Julie Earl, Co- PI: Alfredo Carrato. 01/01/2022-31/12/2025.
2. A multi-omic approach for the characterization and early detection of familial pancreatic cancer (PANomics). CanSERV: 1st Open Call for Transnational Service Provision. 2024- 2025. EU Horizon Europe programme. PI: Julie Earl. 01/08/2024-31/07/2025.
3. Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo Plus (FSE+) 2021-2027: (PEJ-2024-TLSAL-GL-33607), PI Julie Earl. 01/03/2025-28/02/2027.
4. PANCAID: PANcreatic CAncer Initial Detection via liquid biopsy. HORIZON-MISS-2021-CANCER-02. PI: Alfredo Carrato. 01/01/2023 – 31/12/2027.
5. EATRIS CONNECT- HORIZON-INFRA-2023-DEV-01-03. (IRYCIS). PI: Laura García Bermejo. 01/05/2024-30/04/2027.

Formación de jóvenes investigadores:

Dirección de Tesis Doctoral:

- Caracterización molecular y desarrollo de nuevos biomarcadores para la detección precoz y el tratamiento del cáncer de páncreas familiar. UAH.
- Medicina Personalizada en cáncer de páncreas: caracterización clínica y molecular. UAH.

Presentaciones en congresos nacionales:

- Título: Familial pancreatic cancer cases have a different mutation profile compared to sporadic cases with potentially targetable mutations
Autores: Emma Barreto, Julie Earl and Alfredo Carrato.
Congreso: Young Oncologist Award (YOA)
Fecha del evento: 8 de marzo 2022.
Entidad organizadora: VISION No 857381
Tipo de comunicación: OralAH.
- Título: Using Varsome Clinical as a tool for NGS studies of familial pancreatic cancer patients.
Autores: Candela Migoyo, Emma Barreto, Julie Earl and Alfredo Carrato.
Congreso: Young Oncologist Award (YOA)
Fecha del evento: 8 de marzo 2022.
Entidad organizadora: VISION No 857381 Tipo de comunicación: Oral
- Título: Molecular characterization through NGS and liquid biopsy of familial pancreatic cancer patients.
Autores: Emma Barreto, Candela Migoyo, Julie Earl, Alfredo Carrato Mena.
Congreso: CIBERONC Jóvenes Investigadores Congreso 2022
Fecha del evento: 14-15/11/2022 Entidad organizadora: CIBER
Tipo de comunicación: Poster
- Título: Germline and somatic mutation profiling in familial pancreatic cancer cases identifies clinically actionable variants.
Autores: Emma Barreto, Julie Earl, Elisa Conde, María E. Castillo, Edurne Ramos, Carolina de la Pinta, Cristina Galindo, Cristina Peña, Manuel Collado Valero, Pablo Reguera, Jorge Villalón López, Alejandra Caminoa, Javier Blázquez, María Muñoz Beltrán, María del Prado Orduña, Sonsoles Sancho, Enrique Vázquez Sequeiros, Eduardo Lobo, M. Laura García Bermejo and Alfredo Carrato. Congreso: AESPANC Congreso 2022
Fecha del evento: 17-19/02/2022 Entidad organizadora: AESPANC
Tipo de comunicación: Presentación Oral

Internacionalización

Hemos establecido colaboraciones con consorcios internacionales centrados en el cáncer de páncreas, incluido el Pancreatic Cancer Early Detection (PRECEDE) Consortium, una red global de expertos cuyo objetivo es mejorar la detección precoz, la vigilancia, el modelado del riesgo y la prevención en personas con riesgo hereditario (<https://precedestudy.org/>).

Participamos en el consorcio del Cancer of the Pancreas Screening Study (CAPS) consortium, que evalúa la vigilancia para la detección precoz en individuos de alto riesgo (HRI) y promueve el descubrimiento de nuevos biomarcadores

(<https://pathology.jhu.edu/pancreas/participating-research/caps>). Juntos desarrollamos guías de consenso y recomendaciones sobre la notificación de hallazgos por imagen en programas de vigilancia, que influyen en la generación de políticas científicas centradas en la salud.

Formamos parte de la Alianza de Investigación en Cáncer de Páncreas (ALIPANC), una iniciativa española que reúne a centros clínicos, grupos de investigación y profesionales sanitarios con el objetivo de impulsar la investigación traslacional y clínica en cáncer de páncreas.

Participamos en la acción COST CA21116 TRANSPAN, con el objetivo de identificar biomarcadores para la prevención y la medicina traslacional en el cáncer de páncreas, coordinando el grupo de formación, organizando talleres COST para jóvenes investigadores, con el fin de promover el aprendizaje interdisciplinario y el desarrollo de habilidades transferibles, fomentando oportunidades de networking, mentoría y colaboración científica

Patient Advocacy:

Hemos fortalecido colaboraciones con asociaciones europeas de patient advocacy, con el objetivo de aumentar el impacto de nuestro proyecto y línea de investigación en la sociedad y entre los stakeholders de cáncer de páncreas, incluyendo:

Pancreatic Cancer Europe (PCE): una plataforma europea que reúne expertos de toda Europa, incluidos académicos, médicos, políticos, grupos de pacientes y periodistas, con un interés común y la voluntad de mejorar la atención a los pacientes con cáncer de páncreas. Alfredo Carrato Mena es presidente de Pancreatic Cancer Europe (PCE) desde el 1 de enero de 2020.

Cancer Patients Europe (CPE): una organización que busca reducir la carga del cáncer sobre los pacientes y supervivientes, sus cuidadores, los sistemas de salud y la sociedad en general, con el objetivo de cocrear políticas que impulsen la prevención, una atención oncológica de alta calidad, tratamiento y supervivencia en Europa.

Estatus actual y el futuro de la línea de investigación:

Este proyecto forma parte de una línea de investigación estable iniciada por el Dr. Alfredo Carrato en 2009, financiada por cuatro proyectos consecutivos del Fondo de Investigación en Salud del ISCIII (AES: PI09/02221, PI12/01635, PI15/02101 y PI18/01034), así como por fondos europeos (TRANSCAN y Horizonte Europa, HORIZON-MISS-2021-CANCER-02) y financiación privada de ACANPAN, Fundación Mutua Madrileña e Immunovia.

Debido a la jubilación del Dr. Carrato de la práctica clínica, la transición del liderazgo se ha venido realizando de forma progresiva desde 2020, hasta que en 2022 la Dra. Julie Earl asumió la coordinación de esta línea como investigadora principal, contando ya con financiación competitiva como investigadora independiente.

El grupo de investigación actual forma parte del recién creado grupo Biomarcadores y Medicina Personalizada en Cáncer (BioPAC) del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), liderado por el Dr. Bruno Sainz. Nuestro equipo de investigación traslacional en cáncer de páncreas está compuesto por un grupo multidisciplinar consolidado que incluye especialistas en gastroenterología, radiología, cirugía, oncología y anatomía patológica, así como científicos básicos senior y júnior, la mayoría de los cuales llevan más de 10 años colaborando en investigación sobre cáncer de páncreas y en el registro PANGENFAM.

Hemos consolidado colaboraciones nacionales e internacionales, ganando reconocimiento en el campo, aumentando nuestra visibilidad como grupo competitivo. Asimismo, hemos reforzado nuestras alianzas en las áreas de cáncer de páncreas y biopsia líquida tanto a nivel nacional como internacional:

- Plataforma ISCIII de Biobancos y Biomodelos
- Alianza de Investigación en Cáncer de Páncreas (ALIPANC)
- Grupo de biopsia líquida de CIBERONC
- Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD)
- Revista Española de Enfermedades Digestivas (REED)
- Acción COST CA21116 TRANSPAN
- Consorcio de detección precoz PRECEDE



Beca 2020 (Básica)

Javier Martínez-Useros:

Javier Martínez-Useros realizó su doctorado en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra), donde desarrolló el primer modelo animal de linfoma de células del manto, hasta entonces inexistente (PNAS, 2011).

Posteriormente, llevó a cabo una estancia en el laboratorio de linfomas del Dr. Ari Melnick en el Weill Cornell Medical College (Nueva York, EE. UU). Más adelante, se incorporó al laboratorio de oncología del Dr. Jesús García-Foncillas en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Fundación Jiménez Díaz, donde inició su trayectoria investigadora en cáncer colorrectal.

Desde 2016, ejerce como investigador senior, centrado en el estudio de biomarcadores y nuevas terapias contra el cáncer de páncreas. Hasta la fecha, ha publicado más de 60 artículos científicos, ha sido investigador principal en tres proyectos competitivos y desempeña labores docentes en la Universidad Rey Juan Carlos.

TITULO:

Exosomas para mejorar la efectividad y reducir la toxicidad de los tratamientos contra el cáncer de páncreas.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Javier Martínez-Useros

Centro de realizacion: Translational Oncology Division, Health Research Institute Fundación Jimenez Diaz, Fundación Jimenez Díaz University Hospital, 28040 Madrid, Spain

Physiology Area: Department of Basic Health Sciences, Health Sciences Faculty, University Rey Juan Carlos, Alcorcon, 28933 Madrid, Spain.

Introducción

La elección del tratamiento en pacientes con cáncer de páncreas metastásico depende de múltiples factores, entre ellos el estado general del paciente, las comorbilidades y la expectativa de respuesta. Los dos tratamientos de referencia en primera línea son FOLFIRINOX y la combinación de Gemcitabina con Nab- Paclitaxel, ambos con evidencia sólida de mejora en la supervivencia frente al uso exclusivo de Gemcitabina.

El régimen FOLFIRINOX es una combinación de 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y oxaliplatino que fue evaluado en el estudio de Conroy et al. (2011), que incluyó a pacientes con buen estado funcional (ECOG 0-1). Este tratamiento demostró una mediana de supervivencia global (OS) de 11.1 meses, significativamente superior a los 6.8 meses observados con Gemcitabina sola. Asimismo, la supervivencia libre de progresión (PFS) fue de 6.4 meses, con una tasa de respuesta objetiva (ORR) del 31.6%.

Por otro lado, la combinación de Gemcitabina y Nab-Paclitaxel fue evaluada en el ensayo clínico IMPACT (Von Hoff et al., 2013), que incluyó una población algo más heterogénea en cuanto al estado funcional (ECOG 0-2). En este estudio, la mediana de supervivencia global fue de 8.5 meses, comparado con 6.7 meses para Gemcitabina sola. La PFS alcanzó los 5.5 meses y la tasa de respuesta fue del 23%. En términos comparativos, FOLFIRINOX parece ofrecer una mayor supervivencia tanto global como libre de progresión, así como una mayor tasa de respuesta. Sin embargo, esto se asocia a una mayor toxicidad, motivo por el cual su uso se reserva habitualmente a pacientes con buen estado general. Gemcitabina más Nab-Paclitaxel representa una alternativa eficaz y mejor tolerada en pacientes con menor reserva funcional.

Los exosomas son vesículas extracelulares de pequeño tamaño (30–150 nm), liberadas por casi todos los tipos celulares, que desempeñan un papel clave en la comunicación intercelular. Estas vesículas son secretadas al medio extracelular mediante la fusión con la membrana plasmática. Su contenido incluye lípidos, proteínas, ADN, ARN mensajero y microARN, lo que les permite modificar el comportamiento de las células receptoras (Raposo & Stoorvogel, 2013).

En condiciones fisiológicas, los exosomas están implicados en procesos como la regulación inmunitaria, la regeneración tisular y la homeostasis. En el contexto patológico, especialmente en el cáncer, los exosomas pueden favorecer la progresión tumoral al facilitar la angiogénesis, la evasión inmune y la formación de metastásis (Kalluri & LeBleu, 2020). Debido a su biocompatibilidad, estabilidad en circulación y capacidad para transportar biomoléculas específicas, los exosomas han despertado un creciente interés como herramientas de comunicación celular.

Sin embargo, una de las aplicaciones más prometedoras es el uso de exosomas como portadores de tratamientos. A diferencia de los sistemas sintéticos de liberación de fármacos, los exosomas presentan una toxicidad reducida y una mayor afinidad o tropismo positivo por sus propios tejidos, lo que mejora la eficiencia terapéutica y reduce los efectos adversos. Se ha demostrado que los exosomas pueden cargarse eficientemente con fármacos como Doxorrubicina, Paclitaxel o Gemcitabina, y ser dirigidos hacia células tumorales, incluso cruzando barreras biológicas como la hematoencefálica (Pascucci et al., 2014; Kamerkar et al., 2017).

Como portadores de tratamientos, los exosomas se han evaluado en cáncer de mama cargados con Paclitaxel y pueden inducir apoptosis en células tumorales resistentes (Pascucci et al. 2014). En glioblastoma multiforme lograron administrar un siRNA que permitió el paso a través de la barrera hematoencefálica (Alvarez-Erviti et al. 2011) y otros estudios consiguieron administrar Doxorrubicina, con resultados alentadores en modelos preclínicos (Yang et al., 2015).

En cáncer de pulmón, estudios como el de Wang et al. (2021) han empleado exosomas derivados de células madre cargados con Docetaxel. Los exosomas también han sido probados en melanoma metastásico, donde han demostrado una alta eficiencia de administración de fármacos. En particular, el estudio de Tian et al. (2014) desarrollaron exosomas dirigidos por ligandos específicos hacia células de melanoma, cargados con doxorrubicina, observando una inhibición tumoral significativa en modelos murinos. Con respecto al cáncer de páncreas, Kamerkar et al. (2017) utilizaron exosomas para transportar ARN de interferencia (siRNA) dirigido contra KRAS mutado.

En nuestro estudio, nos centramos en primer lugar en evaluar el tropismo positivo de los exosomas producidos por las células tumorales derivadas de cáncer de páncreas. Además, evaluamos la capacidad de carga de estos exosomas comparándolos con los tratamientos que se utilizan en la práctica clínica habitual: FOLFIRINOX o Gemcitabina/Nab-Paclitaxel, para proporcionar un racional que justifique el uso de los exosomas cargados con fármacos en el manejo de los pacientes con cáncer de páncreas. Puesto que los exosomas proceden de líneas celulares tumorales, evaluamos que otros factores podrían estar trasmitiéndose a las células vecinas. Aquí descubrimos uno con potencial para ser usado como diana terapéutica y aumentar la respuesta a los fármacos.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares representativas del adenocarcinoma ductal pancreático humano (PDAC) adquiridas de ATCC: BxPC-3, PANC-1, MIA PaCa- 2, PL45, PANC04.03 y SK-Co-5. Se cultivaron en medios RPMI-1640 o DMEM con 10% FBS y antibióticos, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Como controles no tumorales, se emplearon hTERT-HPNE, MCF10A y CCD- 18Co, cultivadas en medios específicos. Todas las células se mantuvieron a 37°C con 5% CO2 y se usaron entre los pases 5 y 20.

Muestras de pacientes

Se incluyeron muestras de 165 pacientes con cáncer pancreático resecado por duodenopancreatectomía entre 2007 y 2013 en la Unidad de Cirugía Hepatobilial y Pancreática (Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos), y las muestras fueron proporcionadas por su Biobanco institucional (B.0000725; PT17/0015/0040; ISCIII-FEDER). El comité de ética institucional del Hospital Universitario Clínico San Carlos evaluó el presente estudio y otorgó su aprobación el 10 de marzo de 2017 con el número de aprobación no 17/091-E. Solo se analizaron casos con márgenes negativos (R0) y datos completos de supervivencia. Se construyeron micromatrices de tejido (TMAs) a partir de bloques FFPE, revisados por un patólogo experto.

Análisis de datos TCGA

PDAC del dataset TCGA Firehose Legacy (cBioPortal). Los valores se transformaron en z-score. La mediana se utilizó como punto de corte para dividir a los pacientes en grupos de alta y baja expresión.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizaron IHQ en TMAs usando anticuerpos específicos y detección con HRP-DAB. Las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas, bloqueadas y teñidas, finalizando con contraste en hematoxilina e imágenes adquiridas con microscopio Leica DMi1.

Aislamiento de exosomas

Los exosomas fueron obtenidos de medios sin FBS tras 48 h de cultivo celular. Se realizaron centrifugaciones sucesivas ($300 \times g$, $2.000 \times g$, $10.000 \times g$) y una ultracentrifugación final a $100.000 \times g$. Los exosomas fueron resuspendidos en PBS y almacenados a -80°C .

Caracterización de exosomas

Se evaluaron mediante NTA (NanoSight NS300), TEM con tinción negativa (acetato de uranilo), y Western blot para marcadores como CD63, CD81, CD9, HSP70, TSG101 y Calnexina. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio electrónico FEI Tecnai 12.

Microscopía confocal

Se cultivaron células con exosomas marcados con PKH67 y se tiñeron con CellMaskTM (membrana) y DAPI (núcleo). Las imágenes fueron captadas con un microscopio confocal Leica TCS-SP5.

Citometría de flujo

Exosomas PKH67-marcados se incubaron con células durante 1 h a 37°C . La captación se midió en un FACS Canto II (BD Biosciences), analizando 10.000 eventos/muestra.

Ensayo de apoptosis

Se trataron células (BxPC-3, PL45, PANC04.03) con exosomas (20 µg/mL) y fármacos (Gemcitabina/Nab-Paclitaxel). Se midió apoptosis por citometría usando Annexina V-APDACE IP. Se analizaron al menos tres experimentos independientes.

Carga de exosomas con fármacos

Se mezclaron 50 µg de exosomas con fármacos (FOLFIRINOX o Gem/Nab- Paclitaxel) y se sometieron a ciclos de sonicación y posterior incubación. Los exosomas cargados fueron lavados y ultracentrifugados para eliminar fármaco libre.

Viabilidad celular (MTT)

Células tratadas con exosomas y fármacos se cultivaron por 48–72 h, seguido de incubación con MTT (0.5 mg/mL). Se midió absorbancia a 570 nm. Resultados expresados como porcentaje de viabilidad respecto a controles.

Ensayo de migración

Se sembraron PL45 y BxPC-3 en placas de 96 pocillos. Tras herida mecánica, se trataron con exosomas y fármacos. Se tomaron imágenes a 0, 6, 24 y 48 h. El área fue cuantificada con ImageJ.

Cuantificación de fármacos (HPLC-MS/MS)

Se desproteinizaron exosomas cargados con acetonitrilo y se analizaron mediante UHPLC-MS/MS (EVOQTM ELITE, Bruker). La cuantificación se realizó por curvas de calibración para Gemcitabina, Paclitaxel, irinotecán, oxaliplatino y 5-FU.

Marcaje TMT 10-plex y preparación proteica

Se utilizó la técnica TMT 10-plex para analizar la desregulación proteica en exosomas de una línea pancreática no tumoral y tres tumorales resistentes a tratamientos. Se procesaron 20 µg de proteína exosomal por muestra, que fueron reducidas, alquiladas y unidas a perlas magnéticas para su digestión con tripsina durante la noche. Los péptidos obtenidos se etiquetaron con isótopos TMT, combinaron, desecaron y fraccionaron en 12 partes mediante cromatografía de fase reversa a pH alto, almacenándose a -80 °C para su análisis posterior.

Análisis por LC-MS/MS

Se utilizó la técnica TMT 10-plex para analizar la desregulación proteica en exosomas de una línea pancreática no tumoral y tres tumorales resistentes a tratamientos. Se procesaron 20 µg de proteína exosomal por muestra, que fueron reducidas, alquiladas y unidas a perlas magnéticas para su digestión con tripsina durante la noche. Los péptidos obtenidos se etiquetaron con isótopos TMT, combinaron, desecaron y fraccionaron en 12 partes mediante cromatografía de fase reversa a pH alto, almacenándose a -80 °C para su análisis posterior.

Análisis de datos proteómico

Los archivos raw se analizaron con MaxQuant v1.6.6.0 usando cuantificación por “Reporter ion MS2” y la base de datos Uniprot Homo sapiens. Se permitieron tolerancias de masa de 20 ppm para Orbitrap y 4,5 ppm para precursores. Se consideraron modificaciones fijas y variables, y se corrigieron isotopías según fabricante. Solo se cuantificaron péptidos únicos y “razor” de al menos 7 aminoácidos, con FDR del 1%. Se incluyeron proteínas con al menos un péptido confiable, excluyendo contaminantes. La normalización por carga de muestra se realizó en R Studio, y los datos se exportaron a Excel. Para el análisis, se usaron proteínas detectadas en ≥ 3 muestras; se consideraron desreguladas las que mostraron expresión ≥ 1.5 o ≤ 0.67 con $p < 0.05$.

Análisis estadístico

La supervivencia libre de progresión se definió como el intervalo entre cirugía y recaída (local o a distancia). La supervivencia global, como el tiempo entre cirugía y fallecimiento. Se representaron curvas de Kaplan–Meier y se evaluaron diferencias con prueba log-rank. El modelo univariante de riesgos proporcionales de Cox se utilizó para estimar hazard ratios e intervalos de confianza de proteínas y variables clínicas. Solo variables significativas se incluyeron en análisis multivariantes. Comparaciones entre dos variables independientes se hicieron con prueba U de Mann–Whitney. El software IBM-SPSS Statistics v20 se usó para análisis estadísticos, considerando significancia a $p < 0.05$.

Resultados

1.- BxPC-3 y PANC-1 producen mayor cantidad de exosomas y PANC-1 presenta mayores niveles de proteínas específicas de exosomas

Para identificar qué líneas celulares derivadas de PDAC producían más exosomas y con mayor especificidad, evaluamos varias líneas tumorales (BxPC-3, Panc-1, MiaPaca-2, PANC04.03 y PL45), una línea normal pancreática (hTERT-HPNE) y una línea de carcinoma colorrectal (SK-Co-15) como control. Aislamos las exovesículas por ultracentrifugación secuencial y analizamos su tamaño con tecnología NTA (NanoSight), observando un promedio de 150 nm (rango 145–209 nm) (Figura 1A).

Figura 1A

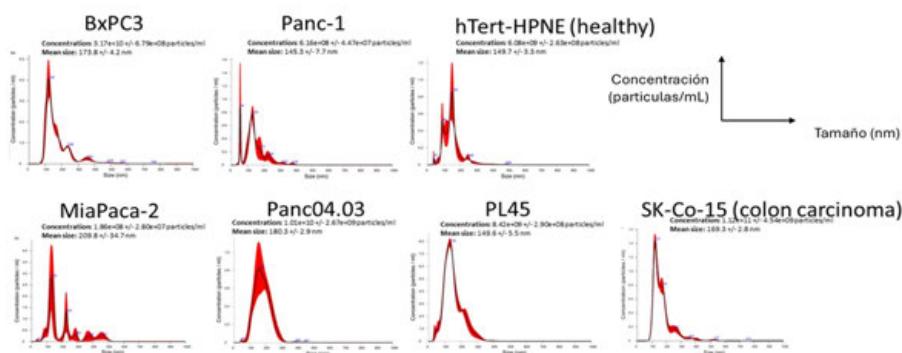


Figura 1A. Caraterización mediante NTA del tamaño de las exovesículas.

Confirmamos tamaño y morfología mediante microscopía electrónica de barrido, observando estructuras compatibles con exovesículas a pesar de deformaciones por deshidratación (Figura 1B).

Figura 1B

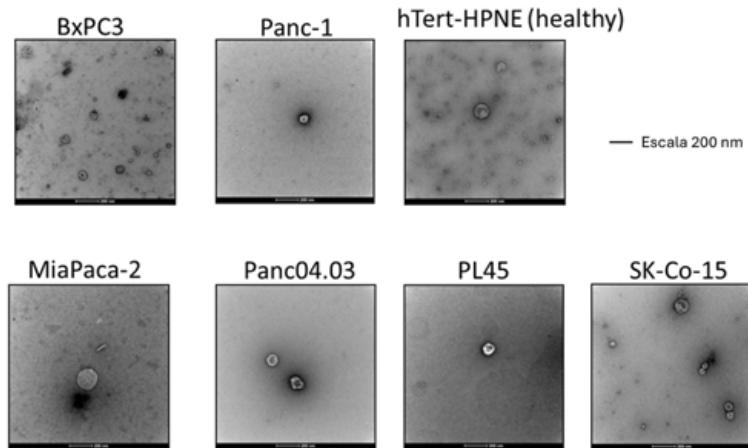


Figura 1B. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de las exovesículas. Barra de escala 200μm.

Para seleccionar líneas con alta producción, cultivamos células en frascos T175 y cuantificamos los exosomas en el medio. BxPC-3 y Panc-1 fueron las que produjeron mayores concentraciones ($1,6 \pm 1,1$ y $1,9 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente) (Figura 1C).

Figura 1C

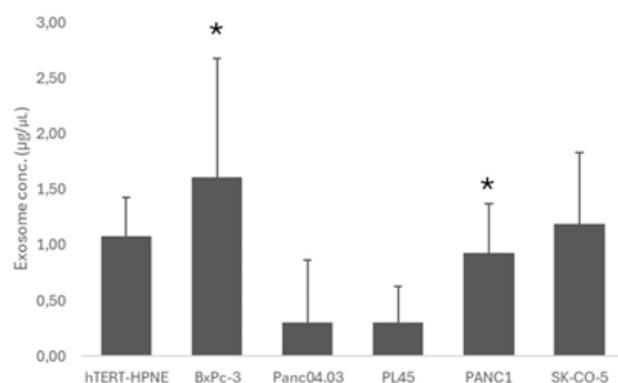


Figura 1C. Cuantificación de la concentración de exovesículas en T175 con 25 mL de medio de cultivo

Aunque hTERT-HPNE y SK-Co-15 también generaron niveles altos, fueron descartadas por no ser específicas de PDAC. No obstante, SK-Co-15 se mantuvo como control de otra patología neoplásica.

Evaluamos proteínas exosomales (CD9, TSG101, CD63) y no exosomales (Calnexina, HSP70) mediante western blot, comparando exosomas y lisados celulares en BxPC-3, Panc-1 y SK-Co-15. Todas expresaron marcadores de exosomas con baja presencia de proteínas no específicas (Figura 1D).

Figura 1D

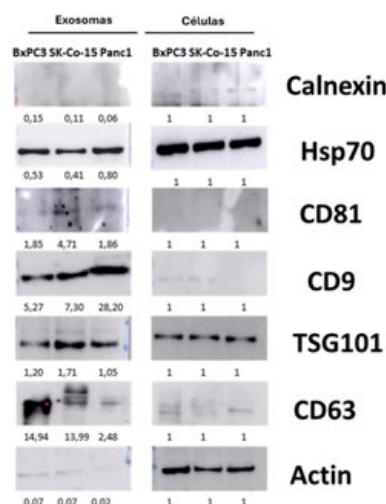


Figura 1D. Expresión de proteínas específicas y excluyentes de exosomas. La cuantificación de actina se utilizó como proteína control negativo de exosomas puesto que los exosomas no poseen citoesqueleto para normalizar la expresión de las demás proteínas.

Panc-1 mostró mayor expresión de CD9 y BxPC-3 de CD63, por lo que decidimos continuar los estudios con ambas líneas y SK-Co-15.

2.- Determinación del tropismo de los exosomas derivados de cáncer de páncreas

Para determinar qué exosomas presentan mayor tropismo por células derivadas de PDAC, aislamos exosomas de las líneas BxPC-3, Panc-1 y SK-Co-15 (control no pancreático). Los marcamos con un colorante de membrana verde y los incubamos con diversas líneas celulares: todas las derivadas de PDAC disponibles en el laboratorio, la línea normal pancreática hTERT-HPNE, y líneas normales de mama (MCF10A) y colon (CCD-18-Co). Tras 24 horas, lavamos las células para eliminar exosomas no internalizados y evaluamos la fluorescencia verde mediante citometría de flujo. Como control, se usaron las mismas líneas incubadas con exosomas sin marcar (Figura 2A).

Figura 2A



Figura 2A. Esquema del experimento para la evaluación del tropismo de los exosomas in vitro mediante citometría de flujo

Observamos que los exosomas de Panc-1 (ExoPanc-1) y BxPC-3 (ExoBxPC-3) fueron captados por todas las líneas derivadas de PDAC, excepto por BxPC-3, que mostró una captación moderada (Figura 2B y 2C).

Figura 2B

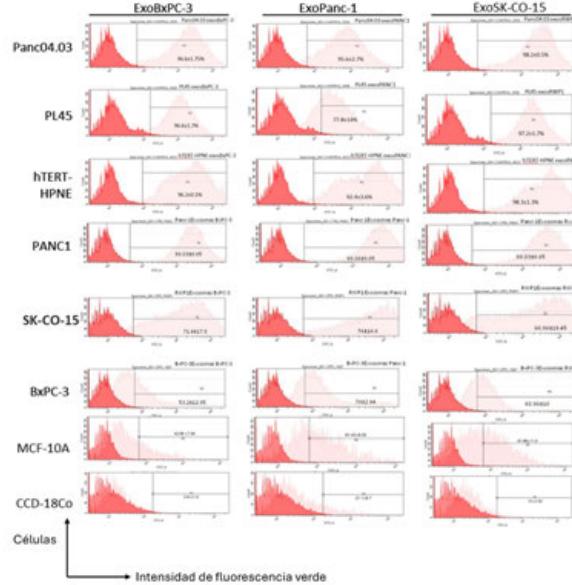


Figura 2B. Histograma con la expresión de las células adquiridas por el citómetro por el control en rojo intenso comparado con la expresión de las células cultivadas con los exosomas marcados en rojo suave.

Figura 2C

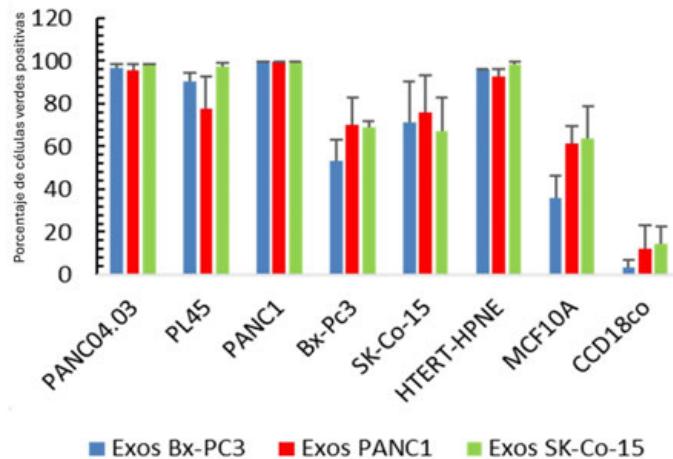


Figura 2C. Gráfica de barras de las células cultivadas para comprobar qué líneas presentan mayor tasa de adquisición de exosomas marcados.

La línea SK-Co-15 también presentó captación moderada, mientras que las líneas normales de mama y colon mostraron niveles muy bajos (Figura 2C). En contraste, la línea normal de páncreas (hTERT-HPNE) sí mostró alta captación. En general, los exosomas de Panc-1 presentaron el mayor tropismo, seguidos por los de SK-Co-15 y luego BxPC-3 (Figura 2D).

Figura 2D

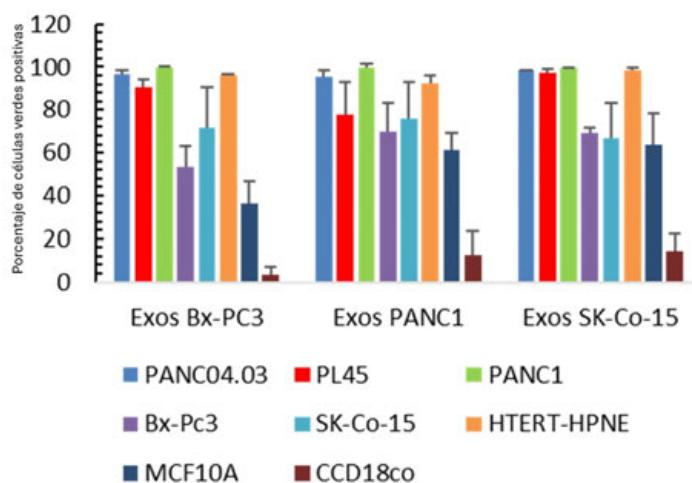


Figura 2D. Gráfica de barras de los exosomas marcados para determinar, cuales presentan mayor tasa de tropismo sobre las células cultivadas.

Para confirmar estos resultados, realizamos microscopía confocal *in vivo* tras marcar la membrana/citoplasma celular en rojo y el núcleo en azul. Las imágenes correspondientes a exosomas de BxPC-3, Panc-1 y SK-Co-15 se muestran en las Figuras 3A, 3B y 3C, respectivamente.

Figura 3A,3B y 3C

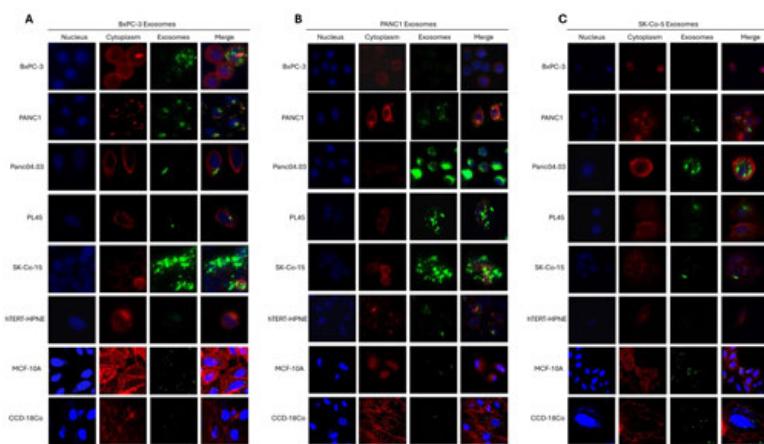


Figura 3. Evaluación del tropismo de los exosomas *in vivo* mediante microscopía confocal. A), B) y C) se muestran imágenes representativas de las células tumorales y normales cultivadas con los exosomas de BxPC-3, Panc-1 y SK-Co-15 respectivamente. En Rojo la membrana/citoplasma, Verde los exosomas y Azul el núcleo de las células.

Los análisis por microscopía confocal revelaron que los exosomas de Panc-1 mostraron mayor penetrancia en las líneas tumorales pancreáticas Panc-1, PL45, Panc04.03 y BxPC-3. En cambio, los exosomas de BxPC-3 mostraron afinidad principalmente por su propia línea y por Panc-1, aunque también penetraron notablemente en la línea tumoral de colon SK-Co-15.

Observamos que los exosomas derivados de PDAC tenían un tropismo muy bajo hacia células normales de páncreas, mama y colon, lo que sugiere una alta especificidad hacia células tumorales pancreáticas (Figura 3D).

Figura 3D

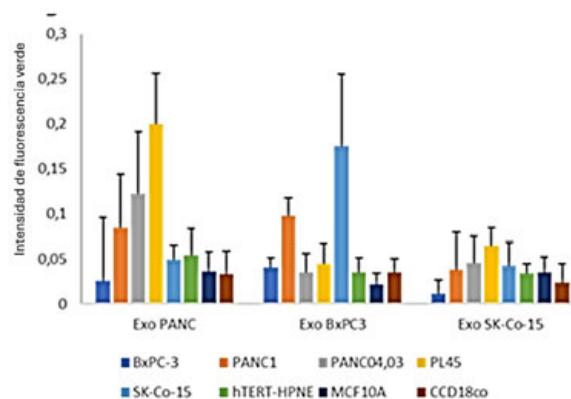


Figura 3D. Gráfica de barras de los exosomas marcados para evaluar, cuales presentan mayor tasa de tropismo sobre las células cultivadas.

Además, los exosomas de SK-Co-15 presentaron los niveles más bajos de penetrancia en todas las líneas celulares evaluadas, lo cual refuerza su utilidad como control negativo (Figura 3D). Tras analizar, por línea celular, pudimos comprobar que las líneas con mayor captación de exosomas son la Panc-1, Panc.04.03, PL45, y la línea tumoral de colon, SK-Co-15; mientras las líneas normales de pancreas (hTERT-HPNE), la normal de mama (MCF10A) y la normal de colon (CCD-18-Co) presentaban unos niveles de captación de exosomas muy bajos. Este resultado confirma que alta especificidad de los exosomas tumorales hacia las células tumorales y más baja hacia las células sanas (Figura 3E).

Figura 3E

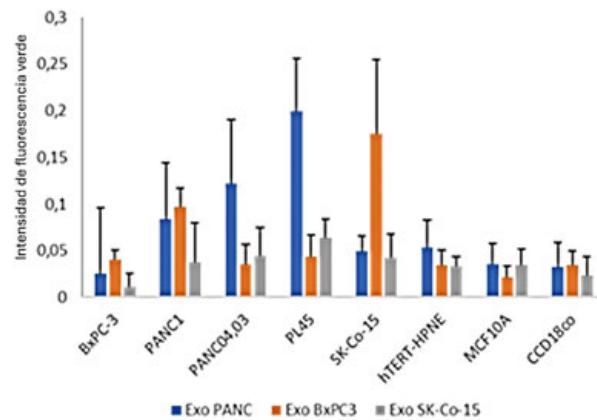


Figura 3E. Gráfica de barras de las células cultivadas para comprobar qué líneas celulares presentan mayor tasa de adquisición de exosomas marcados.

3.- Determinación de la concentración de fármaco encapsulado en los exosomas

Tras comprobar que los exosomas de Panc-1 mostraban mayor tropismo, evaluamos la concentración individual de fármacos cargados en ellos. Se intentó cargar Gemcitabina + Nab-Paclitaxel y los componentes del esquema FOLFIRINOX (leucovorin, 5FU, irinotecan y oxaliplatino). No se pudo incluir leucovorin, ya que interfería en la cuantificación proteica por microBCA, y además no tiene acción antitumoral directa, sino sinérgica con 5FU. Por ello, los exosomas se cargaron con 5FU, irinotecan y oxaliplatino, y luego se analizaron por HPLC.

Se generaron curvas patrón de cada fármaco para estimar su concentración en los exosomas de Panc-1 (Figura 4A).

Figura 4A

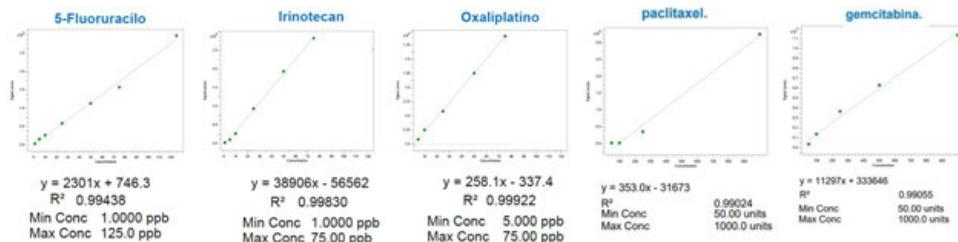


Figura 4A. Diferentes curvas patrón con cada uno de los fármacos individuales. Todas las curvas tienen un R^2 de 0.99; además, se muestra la ecuación de la recta para extrapolar los valores de la concentración.

El análisis reveló que no se detectó oxaliplatin. Los exosomas cargaron entre 12685–12354 ppb de 5FU ($\approx 0,012 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y entre 185–165 ppb de irinotecan ($\approx 0,0001857 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 4B).

Figura 4B

Panc1-1		SAMPLE		
AnalyteName	RT[min]	Area	Height	Concentration
5-Fluoruracilo	1.27	254637	20326	12685.6 ppb
Irinotecan	4.17	706674	107858	185.7 ppb
Panc1-2		SAMPLE		
AnalyteName	RT[min]	Area	Height	Concentration
5-Fluoruracilo	1.27	248069	20089	12354.0 ppb
Irinotecan	4.18	626840	94042	165.1 ppb

Figura 4B. Dos determinaciones independientes de la concentración de 5FU e irinotecan en exosomas de Panc-1.

En cuanto a Gemcitabina y Nab-Paclitaxel, se alcanzaron 39097 ppb ($\approx 0,039 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 222035 ppb ($\approx 0,222 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) respectivamente (Figura 4C).

Figura 4C

Exosomes	RT[min]	Area	Height	Concentration
gemcitabina.	2.39	775325	77431	39097.9 ppb
paclitaxel.	3.96	46713	2527	222035.5 ppb

Figura 4C. Determinación de la concentración de Gemcitabina y Nab-Paclitaxel en exosomas de Panc-1.

4.- Los exosomas de Panc-1 presentan una actividad antitumoral similar al fármaco libre, pero con una décima parte de fármaco.

Los exosomas de Panc-1 fueron cargados con las concentraciones anteriores de Gemcitabina+Nab-Paclitaxel por un lado, y 5FU+Irinotecan (excluyendo oxaliplatino, que no pudo ser cargado) por otro, y se añadieron a líneas tumorales pancreáticas y a la línea normal hTERT-HPNE para evaluar viabilidad celular (Figura 5A).

Figura 5A

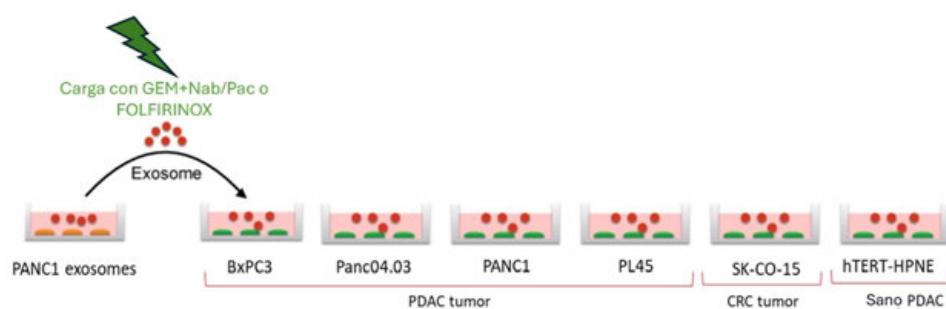


Figura 5A. Esquema del experimento donde los exosomas son cargados con Gemcitabina+Nab- Paclitaxel o con 5FU+irinotecan que son los esquemas de tratamiento utilizados en la práctica clínica habitual para el manejo de los pacientes con cáncer de páncreas.

Los exosomas con Gemcitabina+Nab-Paclitaxel redujeron la viabilidad de las células tumorales de forma similar al tratamiento con los fármacos libres, (0.1652 μ g/ μ L de Gemcitabina + 0.2475 μ g/ μ L of Nab-Paclitaxel), salvo en PL45 y Panc04.03, donde el fármaco libre fue más eficaz (Figura 5B).

Figura 5B

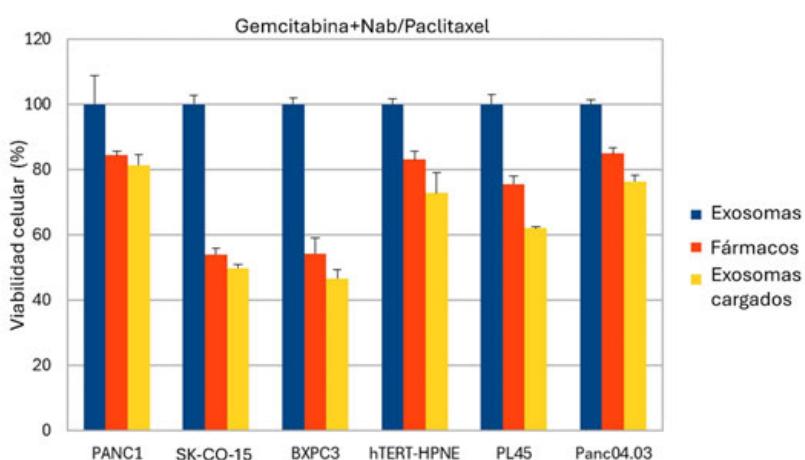


Figura 5B. Gráfica de barras que muestra la viabilidad celular de las diferentes líneas celulares tratadas con exosomas (azul), exosomas cargados con Gemcitabina+Nab-Paclitaxel (amarillo), o con la combinación de fármacos sin exosomas (naranja).

Por tanto, los exosomas cargados mostraron una eficacia antitumoral comparable al tratamiento convencional. Al comparar la concentración de los fármacos cargados en los exosomas con la de los fármacos libres utilizados, se observó que la versión encapsulada contenía aproximadamente 4,2 veces menos Gemcitabina, mientras que la concentración de Nab-Paclitaxel fue similar en ambos casos.

En cuanto a los exosomas con 5FU+Irinotecan, Panc04.03 y Panc-1 mostraron mayor respuesta al fármaco libre (0.1344 µg/µL 5FU; 0.00216 µg/µL irinotecan), pero en PL45 y BxPC-3 no hubo diferencias entre ambas formas. La cantidad de fármaco encapsulado fue en promedio 10,75 veces menor para 5FU y 12,3 veces menor para irinotecan, respecto a las concentraciones libres evaluadas.

Notablemente, la línea normal hTERT-HPNE mantuvo su viabilidad tras el tratamiento con exosomas cargados, mientras que el tratamiento libre redujo su viabilidad en un 60% (Figura 5C).

Figura 5C

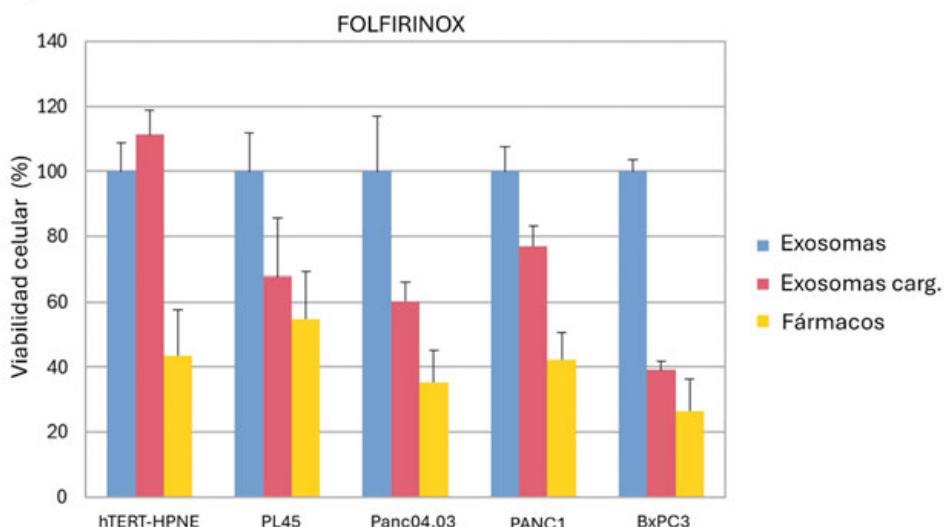


Figura 5C. Gráfica de barras que muestra la viabilidad celular de las diferentes líneas celulares tratadas con exosomas (azul), exosomas cargados con FOLFIRINOX (rojo), o con la combinación de fármacos sin exosomas (amarillo).

Estos resultados demuestran que los exosomas cargados con fármacos tienen un efecto similar in vitro con respecto al fármaco libre mientras reducen la toxicidad de 5FU y irinotecan sobre las células no tumorales puesto que la captación de exosomas de estas células es muy escaso. Además, el efecto tumoral observado se debe a una décima parte de la concentración del fármaco que presenta la misma efectividad antitumoral.

5.- Los exosomas procedentes de líneas celulares tumorales pueden trasmitir quimioresistencia.

Se evaluó si los exosomas de células de cáncer de páncreas resistentes a gemcitabina (GEM) y nab-paclitaxel (Nab-P) podían inducir resistencia en células sensibles. Panc04.03 se identificó como resistente a ambos fármacos, mientras que BxPC-3 y PL45 eran sensibles (Figura 6A).

Figura 6A

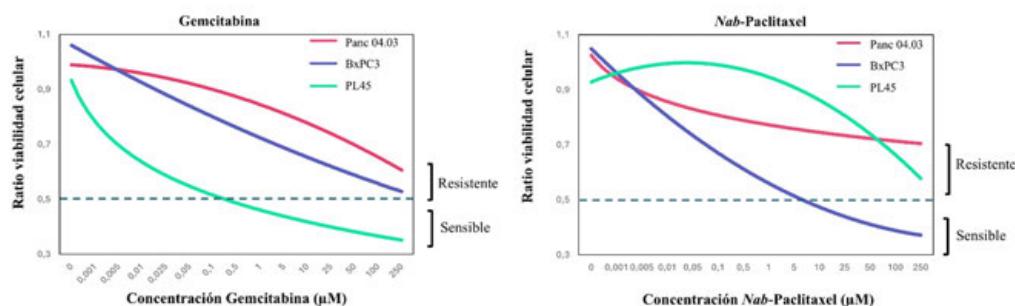


Figura 6A. Determinación de la IC50 de las líneas celulares Panc04.03, PL45 y BxPC3 para determinar la resistencia o sensibilidad a Gemcitabina (GEM) o Nab-Paclitaxel (Nab-P).

Exosomas de Panc04.03 tratadas con GEM+Nab-P se co-cultivaron con PL45 (sensible a GEM) y BxPC-3 (sensible a Nab-P) para analizar viabilidad, apoptosis y migración (Figura 6B).

Figura 6B

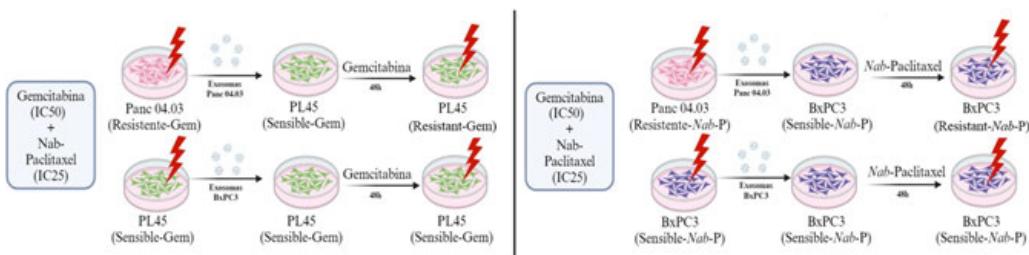


Figura 6B. Esquema del experimento donde se obtienen exosomas de la línea resistente a GEM o a Nab-P, Panc04.03, y de las líneas sensibles a GEM o Nab-P, PL45 y BxPC3 respectivamente tras ser tratadas con la IC50 de GE. Aquí se observa como los exosomas de la línea resistente Panc04.03 con eren resistencia a PL45 mientras que con sus propios exosomas permanece sensible (izquierda). Y como los exosomas de la línea resistente a Nab-P, Panc04.03, con eren resistencia frente a Nab- P a la línea sensible BxPC3 mientras que no lo hacen sus propios exosomas (derecha).

Los exosomas de Panc04.03 aumentaron significativamente la resistencia a GEM en PL45 ($p = 0,032$) y a Nab-P en BxPC-3 ($p = 0,014$), mientras que los exosomas de líneas sensibles no mostraron efecto o incluso redujeron la viabilidad (Figura 6C).

Figura 6C

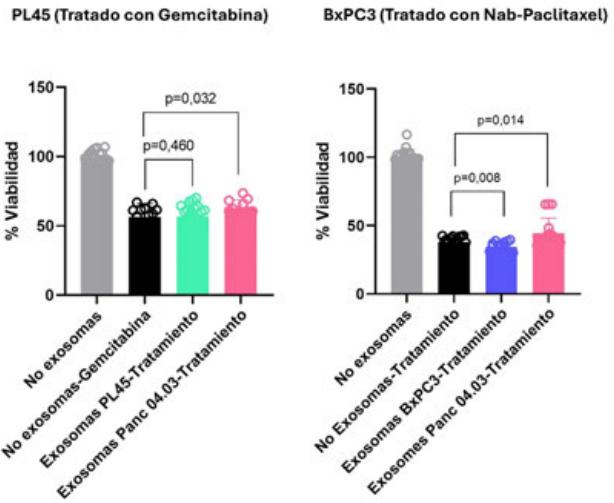


Figura 6C. Gráficos de viabilidad celular de las líneas sensibles PL45 (izq) y BxPC3 (der) cuando son tratados con sus propios exosomas y con los exosomas de la línea resistente a ambos fármacos, Panc04.03.

Además, estos exosomas redujeron significativamente la apoptosis inducida por GEM en PL45 ($p < 0,0001$) y mostraron una tendencia a reducirla en BxPC-3 ($p = 0,085$), sin cambios con exosomas propios (Figura 6D).

Figura 6D

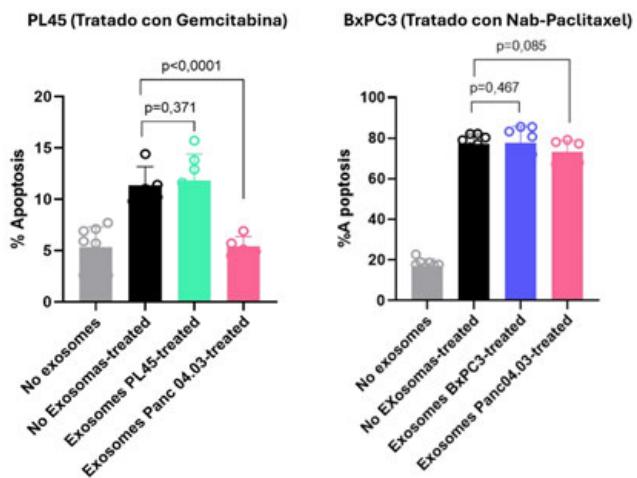


Figura 6D. Gráficos de apoptosis celular de las líneas sensibles PL45 (izq) y BxPC3 (der) cuando son tratados con sus propios exosomas y con los exosomas de la línea resistente a ambos fármacos, Panc04.03.

Por último, los exosomas de Panc04.03 también incrementaron la migración en células PL45 tratadas con GEM ($p < 0,001$) y en BxPC-3 tratadas con Nab-P ($p = 0,024$), mientras que los exosomas autólogos no alteraron este efecto (Figuras 6E y 6F).

Figura 6E

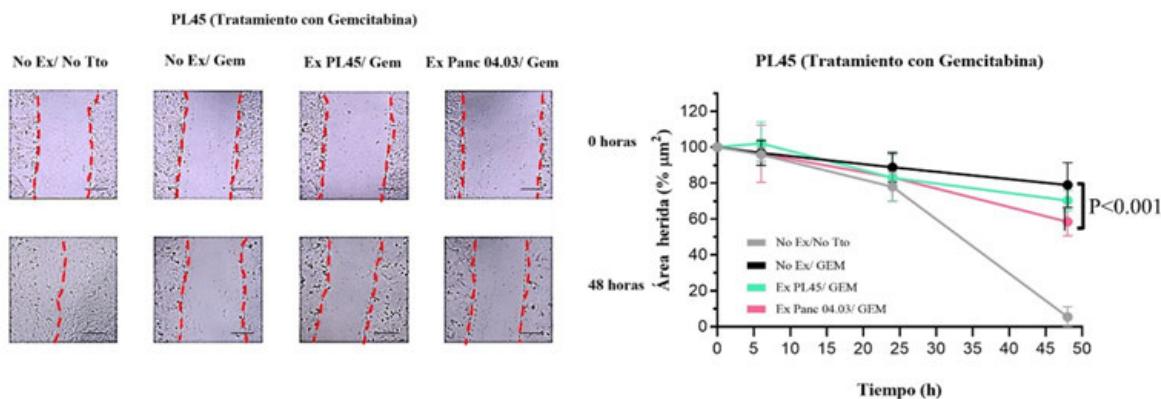


Figura 6E. Microfotografías hechas a 0 horas y tras 48 horas (izq) y análisis del área de migración (der) de la línea sensible a GEM, PL45, a diferentes condiciones. No Ex/No tto: no exosomas/no tratamiento; No Ex/GEM: No exosomas y tratado con Gemcitabina; Ex PL45/GEM: exosomas de PL45 y tratamiento con Gemcitabina; Ex Panc 04.03/GEM: exosomas de Panc04.03 y tratamiento con Gemcitabina; No Ex/Nab-P: No exosomas y tratado con Nab-Paclitaxel; Ex BxPC3/Nab-P: exosomas de BxPC3 y tratado con Nab-Paclitaxel; Ex Panc 04.03/Nab-P: exosomas de Panc04.03 y tratado con Nab-Paclitaxel. P<0.05 se considera estadísticamente significativo.

Figura 6F

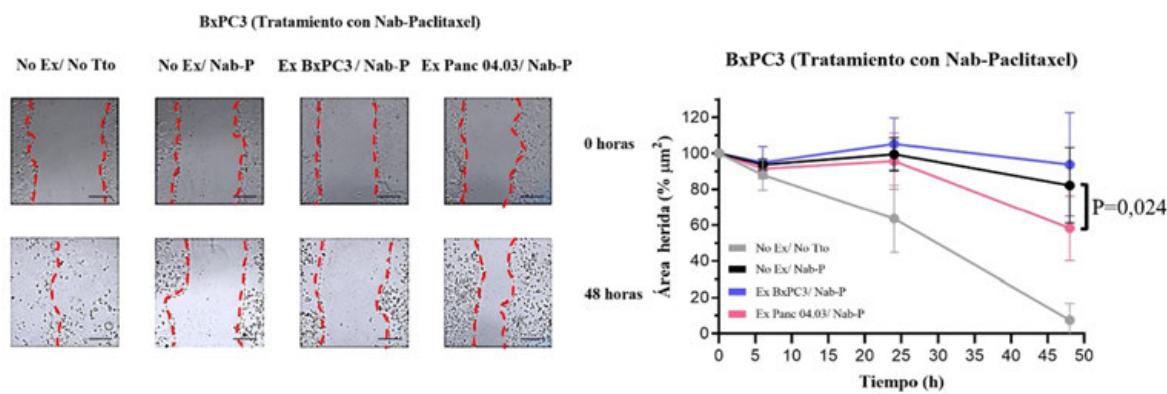


Figura 6F. Microfotografías hechas a 0 horas y tras 48 horas (izq) y análisis del área de migración (der) de la línea sensible a Nab-P, BxPC3, a diferentes condiciones. No Ex/No tto: no exosomas/no tratamiento; No Ex/GEM: No exosomas y tratado con Gemcitabina; Ex PL45/GEM: exosomas de PL45 y tratamiento con Gemcitabina; Ex Panc 04.03/GEM: exosomas de Panc04.03 y tratamiento con Gemcitabina; No Ex/Nab-P: No exosomas y tratado con Nab-Paclitaxel; Ex BxPC3/Nab-P: exosomas de BxPC3 y tratado con Nab-Paclitaxel; Ex Panc 04.03/Nab-P: exosomas de Panc04.03 y tratado con Nab-Paclitaxel. P<0.05 se considera estadísticamente significativo.

Estos hallazgos confirman que los exosomas de células quimioresistente pueden transferir resistencia y promover migración en células sensibles de forma paracrina.

6.- Análisis de proteómica funcional de los exosomas revela 31 proteínas asociadas a quimioresistencia

Se investigaron los factores responsables de la transferencia de quimiorresistencia por exosomas derivados de líneas de cáncer de páncreas (PDAC). Se aislaron exosomas de líneas tumorales sensibles y resistentes a Gemcitabina (GEM) y Nab-Paclitaxel (Nab-P), así como de una línea no tumoral (hTERT-HPNE), antes y después del tratamiento con GEM (IC50) y Nab-P (IC25) durante 24 h. Las proteínas exosomales fueron marcadas y analizadas por espectrometría de masas, generando volcano plots para identificar proteínas diferencialmente expresadas (Figura 7A).

Figura 7A

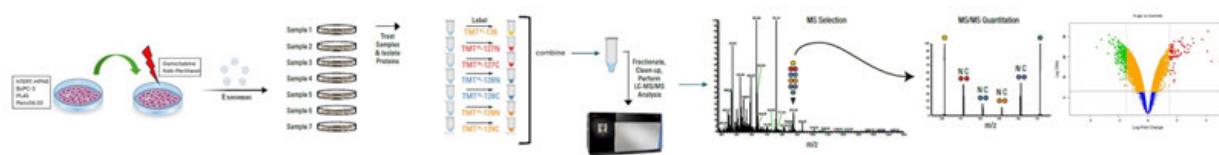


Figura 7A. Esquema del proceso en el que los exosomas de 3 líneas celulares tumorales y de una línea no tumoral (hTERT-HPNE) fueron extraídos antes y después de ser tratadas con IC50 de GEM y IC25 de Nab-P. Las muestras proteicas de los exosomas se marcaron con el kit TMT-multiplex y se analizó mediante espectrometría de masas donde cada pico fue analizado por separado para identificar las proteínas presentes. Posteriormente con un diagrama de Volcano, las proteínas se separaron hacia la izquierda (infraexpresadas) y derecha (sobreexpresadas).

En exosomas de células resistentes a GEM, se detectaron 248 proteínas desreguladas (169 sobreexpresadas); en las sensibles, 238 (157 sobreexpresadas). Comparando ambas condiciones, se identificaron 161 proteínas exclusivas de resistencia a GEM (Figura 7B–arriba). Para Nab-P, se hallaron 179 proteínas desreguladas en células resistentes (111 sobreexpresadas) y 195 en sensibles (186 sobreexpresadas). Se identificaron 94 proteínas exclusivas de resistencia a Nab-P (Figura 7B–abajo).

Un análisis conjunto reveló 31 proteínas sobreexpresadas en exosomas derivados de células resistentes a ambos tratamientos (Figura 7C).

Figura 7B y 7C

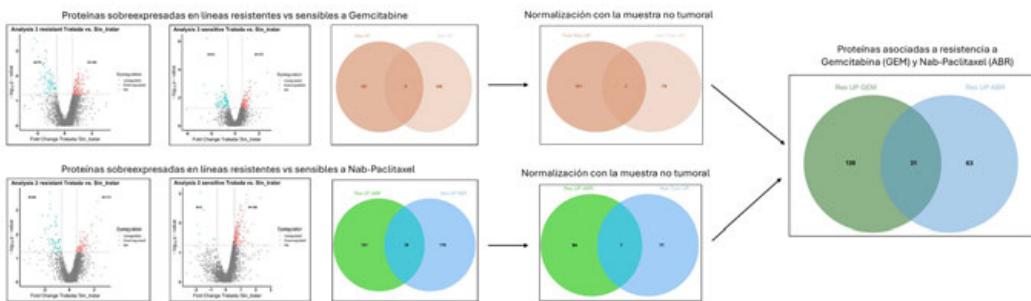


Figura 7B y C. De izquierda a derecha: Volcano plots para las líneas resistentes tratadas y sin tratar, y sensibles tratadas y sin tratar para Gemcitabina (arriba) y Nab-Paclitaxel (abajo). Los círculos muestran los diagramas de Venn, con las proteínas sobreexpresadas en las líneas resistentes vs. las sensibles para Gemcitabina (naranja, arriba) y Nab-Paclitaxel (azul y verde claro, abajo). A continuación, se normalizaron las proteínas diferencialmente expresadas con las proteínas de la línea celular normal. Todo ello, ofreció 31 proteínas asociadas a resistencia tanto a Gemcitabina como a Nab-Paclitaxel. Barra de escala: 50 μ M.

Mediante la base de datos TCGA, se evaluó la relación de estas 31 proteínas con la supervivencia de pacientes con PDAC. Solo tres mostraron asociación con mal pronóstico (Figuras 7D, E y F).

Figura 7D-7E-7F

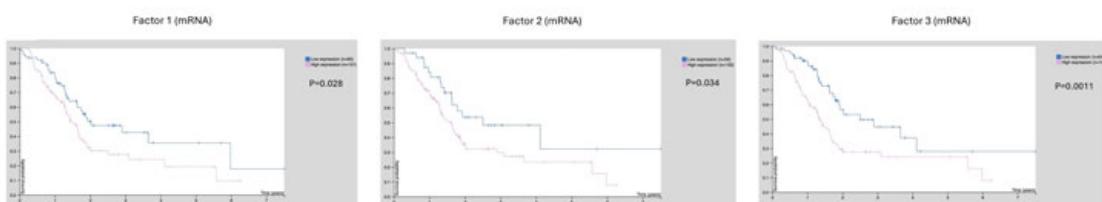


Figura 7D-7E-7F. Curvas de supervivencia global del factor 1, 2 y 3 respectivamente a nivel de mRNA. $P<0.05$ se considera estadísticamente significativo.

En una cohorte institucional de 165 muestras, la inmunohistoquímica confirmó que la sobreexpresión del factor 1 se asociaba significativamente con menor supervivencia global ($p = 0,018$; Figura 7G).

Figura 7G-7H-7I

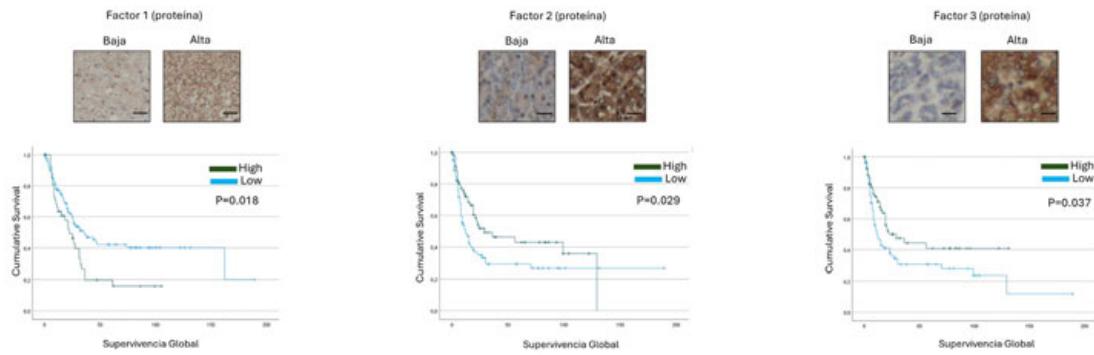


Figura 7G-7H-7I. Validación de las supervivencias de los pacientes según la expresión de los factores 1, 2 y 3 a nivel de proteína. Microfotografías de baja y alta expresión de cada uno de los factores. Curvas de supervivencia global de los factores 1, 2 y 3 a nivel de proteína para alta expresión (verde) y baja expresión (azul). $P<0.05$ se considera estadísticamente significativo.

Aunque a nivel de mRNA los factores 1 y 2 se vincularon con mal pronóstico, a nivel proteico los factores 2 y 3 se asociaron con mejor pronóstico (Figuras 7H y 7I). En conjunto, estos resultados destacan al factor 1 como una potencial diana terapéutica frente a la quimioresistencia en el cáncer de páncreas.

Discusión

El estudio de Kamerkar et al. publicado en *Nature* en 2017, fue uno de los primeros trabajos en demostrar que los exosomas pueden ser usados como vehículos terapéuticos para atacar mutaciones oncogénicas como KRAS G12D en cáncer de páncreas. Aunque es un trabajo pionero y de gran impacto, también presenta varias limitaciones, especialmente en el contexto de su posible traslación clínica. Una de las principales limitaciones es que estos exosomas se dirigieron exclusivamente contra una mutación específica del gen KRAS G12D, que, si bien es prevalente en el cáncer de páncreas, no está presente en todos los pacientes.

El estudio no aborda la posibilidad de mutaciones coexistentes ni evalúa si los tumores pudieran desarrollar mecanismos de escape o resistencia a través de vías alternativas. Esta limitación es especialmente relevante considerando la conocida plasticidad del cáncer pancreático y su capacidad de adaptarse a presiones terapéuticas. Asimismo, lo que se cargó fue un small interfering RNA (siRNA) cuyo potencial de silenciamiento es transitorio y la duración de la inhibición suele ser inferior a 1 semana. Otro punto para considerar es que, si bien se reportó la ausencia de toxicidad evidente y de respuesta inmune en los modelos animales utilizados, el estudio no analizó en profundidad posibles efectos inmunológicos o adversos a largo plazo. Dado que los exosomas utilizados fueron derivados de fibroblastos, su perfil inmunogénico podría ser diferente en humanos, particularmente si se emplean en contextos alogénicos o repetidas veces.

Finalmente, una limitación importante es la ausencia de comparación directa con tratamientos estándar, como FOLFIRINOX o la combinación de Gemcitabina con Nab-Paclitaxel. Esto dificulta valorar si la estrategia basada en exosomas aporta una ventaja terapéutica real respecto a las opciones disponibles actualmente, en especial considerando que las terapias dirigidas en cáncer de páncreas aún enfrentan importantes barreras clínicas.

En nuestro estudio demostramos que los exosomas procedentes de células tumorales presentan una alta afinidad hacia las células tumorales de páncreas. Al ser cargados con fármacos usados en el manejo de pacientes oncológicos, estos exosomas pueden ser captados en mayor medida por las células tumorales con una limitada penetrancia en células normales, lo que aumenta la efectividad del tratamiento y reduce los efectos secundarios.

Por otra parte, nuestros resultados de proteómica funcional de los exosomas de líneas resistentes y sensibles tras ser tratados con tratamientos revelaron una serie de factores que se podrían estar trasmitiendo mediante exosomas a las células vecinas. Tras validar estos factores asociándolos a la supervivencia de los pacientes pudimos identificar uno de ellos como un factor cuya sobreexpresión se asociaba a mal pronóstico y, por lo tanto, podría ser un marcador subrogado de quimioresistencia.

Este nuevo factor descubierto mediante este abordaje proteómico puede abrir nuevas oportunidades para diseñar una nueva terapia que evite la quimioresistencia en células de PDAC, que actualmente es una de las estrategias por la que este tipo de tumores maligniza y reduce la supervivencia de los pacientes.

Conclusión

En el presente estudio demostramos como los exosomas producidos por células tumorales derivadas de cáncer de páncreas aumentan la afinidad hacia las células pancreáticas y limitando el acceso a otras células normales de otros tejidos. Además, tras ser cargados con 5FU+irinotecan o Gemcitabina/Nab- paclitaxel obtenemos una eficiencia antitumoral parecida a los fármacos libres, pero los exosomas permiten usar concentraciones entre 10 veces menor de fármacos.

De esta manera tendríamos una eficiencia parecida, pero con una toxicidad por el tratamiento menor. Esto es de suma importancia porque que en el caso del FOLFIRINOX, que es el que más supervivencia presenta, solamente se administra cuando los pacientes tienen un estado de salud bueno por su elevada toxicidad. La combinación de exosomas cargados con fármacos utilizados en la práctica clínica habitual, junto con un inhibidor del "factor 1" encontrado en este abordaje proteómico, podría mejorar la tasa de respuesta frente a los fármacos actuales contra el cáncer de páncreas, y así mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

Referencias

- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., & Ducreux, M. (2018). FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(25), 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., ... & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature22341>
- Pascucci, L., Coccè, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., ... & Parati, E. (2014). Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 192, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.029>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., & Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383–2390. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
- Wang, J., Tang, W., Yang, M., Yin, Y., Li, H., Hu, F., & Zhang, Y. (2021). Delivery of docetaxel by engineered exosomes for targeted therapy of lung cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(11), 3790–3804. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.05.016>
- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., & Yin, V. P. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharmaceutical Research*, 32(6), 2003–2014. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1593-y>



Beca 2020 (Clínica)

Rocío I. Rodríguez Macías:

Rocío I. Rodríguez Macías es Catedrática de Fisiología de la Universidad de Salamanca e investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD).

Tras doctorarse en Farmacia, realizó estancias postdoctorales en el Hospital Universitario de Zurich (Suiza), en el INSERM-Université Paris-Sud (Francia), en el Centro Nacional de Microbiología de Madrid (España) y en el Hospital Universitario de Düsseldorf (Alemania). En la actualidad lidera la Acción COST Precision-BTC-network, una red de investigación interdisciplinar con más de 500 miembros de 48 países.

Está interesada en la identificación de biomarcadores no invasivos para el diagnóstico precoz de los tumores hepatopancreatobiliares, así como en la identificación de biomarcadores para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico y en el diseño de estrategias para eludir la resistencia a los fármacos.

TITULO:

Búsqueda de biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y la predicción de respuesta al tratamiento farmacológico del cáncer de páncreas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Rocío I. Rodríguez Macías

Profesora Titular de la Universidad de Salamanca. Investigadora del IBSAL y CIBERehd.

Centro de realizacion: Universidad de Salamanca (USAL)

Equipo de Investigación que presentó el Proyecto:

- Dr. José Juan García Marín. Catedrático de la Universidad de Salamanca. IP del grupo de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVEPHARM) del IBSAL y del CIBERehd
- Dra. Elisa Lozano Esteban. Contratada posdoctoral de Universidad de Salamanca. IBSAL/CIBERehd
- Dr. Luis Muñoz Bellvís. Jefe del Servicio de Cirugía general y del aparato digestivo del Hospital Universitario de Salamanca. IP del grupo Cirugía y Cáncer del IBSAL/CIBERONC
- Dr. Luis González Fernández. Médico Especialista en Cirugía general y del aparato digestivo del Hospital Universitario de Salamanca/ IBSAL
- Candela Cives Losada. Contratada predoctoral FPU de Universidad de Salamanca. IBSAL
- Dr. Luis Bujanda Fernández de Piérola. Director del Área de Enfermedades Hepáticas y Gastrointestinales del IIS Biodonostia; IP del CIBERehd
- Dr. Jesús M. Bañales Asurmendi. Investigador Ikerbasque, Profesor Asociado Fundación Vasca para la Ciencia. IP del grupo del Grupo de Enfermedades Hepáticas del IIS Biodonostia
- Dra. Mª Jesús Perugorría Montiel. Investigadora del Área de Enfermedades Hepáticas y Gastrointestinales del IIS Biodonostia, Investigadora Ramón y Cajal (MINECO) y CIBERehd
- Dra. Adelaida La Casta Muñoa. Médico Especialista en Oncología hepatobiliar del Hospital Donostia. Investigadora del IIS Biodonostia

Memoria del proyecto

Antecedentes del tema

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) presenta la supervivencia más baja de todos los tipos de cáncer, con una supervivencia a 5 años de solo un 6% de los pacientes [1], y se prevé que en el año 2030 sea la segunda causa de muerte asociada al cáncer en varios países desarrollados [2]. Su mal pronóstico se debe, en parte, a que presenta una evolución silenciosa en las primeras etapas de desarrollo, por lo que solo un 20% de pacientes son candidatos a cirugía cuando se diagnostican.

Los signos del PDAC son limitados debido a la localización anatómica del páncreas y los síntomas son inespecíficos, como pérdida de peso, cansancio, dolor abdominal o ictericia. Los factores de riesgo son muy diversos e incluyen tabaquismo [3], sobrepeso/obesidad, alcoholismo [4-5] y algunas alteraciones genéticas.

El diagnóstico de estos tumores se realiza por una combinación de técnicas radiológicas y el estudio citológico de biopsias obtenidas por aspiración con aguja fina durante ecoendoscopia pero, incluso tras un estudio de anatomía patológica, no siempre se consigue un diagnóstico definitivo. En ocasiones se requiere la obtención de nuevas muestras porque la calidad no es buena y la detección de células malignas puede confirmar el diagnóstico, pero un resultado negativo no permite descartarlo.

En la actualidad no se dispone de biomarcadores específicos y sensibles para la detección y el seguimiento de los pacientes con PDAC. El antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) se emplea en clínica para detectar una recidiva tumoral tras resección quirúrgica o para seguir la respuesta del tratamiento farmacológico [6], pero se considera muy poco fiable. Respecto a su utilidad diagnóstica, presenta una sensibilidad y especificidad bajas, ya que puede estar elevado en pacientes con colestasis obstructiva, con colangiocarcinoma (CCA) y con enfermedades benignas como pancreatitis o coledocolitis [7,8] y con frecuencia los valores son normales en pacientes con lesiones pretumorales [7]. Además, hay que tener en cuenta que alrededor de un 10% de la población caucásica no expresa este marcador.

Con cierta frecuencia los tumores localizados en la cabeza del páncreas no pueden ser clasificados con certeza como PDAC o CCA distal (dCCA) y los pacientes son tratados de forma similar, sin embargo, son dos tipos de tumores diferentes con distinto pronóstico [9] y que requieren tratamientos con fármacos específicos para que se obtenga una respuesta óptima. La dificultad para alcanzar un diagnóstico fiable entre el PDAC y el dCCA supone un problema grave y justifica que sea urgente buscar nuevos marcadores no invasivos para la detección específica del PDAC.

Los avances en los últimos años de las tecnologías ómicas de alto rendimiento han permitido alcanzar resultados prometedores en el diagnóstico de varios tipos de tumores, incluido el PDAC, algunos de estos trabajos los han liderado los solicitantes de este proyecto [10-15]. En concreto, en un estudio preliminar se habían identificado metabolitos que permitían diagnosticar la presencia de lesiones malignas en la cabeza del páncreas y se había seleccionado un panel de 9 metabolitos que, junto con el CA 19-9, permitían diferenciar entre el PDAC y el dCCA [14].

Se propone validar los resultados en una cohorte más amplia de pacientes y poner a punto un método de análisis de los metabolitos seleccionados por HPLC-MS/MS convencional, que permita que este análisis pueda realizarse de forma más sencilla y que en el futuro se pueda determinar en hospitales. Además, algunas de las proteínas aisladas de EVs de suero [12] parecen discriminar entre PDAC y CCA (datos no publicados), por lo que se pretende confirmar su utilidad diagnóstica en muestras de suero de los mismos pacientes. Además, se analizará si algunos de estos marcadores (metabolitos y/o proteínas) permiten monitorizar la evolución de los tumores.

La única opción curativa para el PDAC es la cirugía más quimioterapia adyuvante, pero la mayoría de los casos se detectan tarde, cuando los pacientes no son candidatos a cirugía. Cuando la cirugía no es una opción, el tratamiento farmacológico de primera línea consiste en FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino) y para los pacientes que no toleran esta terapia se administra gemcitabina +/- nab-paclitaxel. Desafortunadamente, el PDAC es un tumor muy refractario a la quimioterapia y algunos pacientes no responden (quimiorresistencia intrínseca) o con el tiempo recaen (quimiorresistencia adquirida), sin embargo, se conoce poco de los mecanismos de resistencia en cáncer de páncreas [16].

Los niveles de proteínas implicadas en la captación y eflujo de fármacos pueden afectar a la cantidad de compuestos activos que alcanzan sus dianas intracelulares [17], pero no siempre es posible realizar un análisis en muestras de biopsias, por lo que su análisis en EVs aisladas del suero podría permitir determinar los cambios que se producen durante el tratamiento y ajustarlo o utilizar diferentes estrategias para superar la resistencia.

Objetivo

De forma resumida, el objetivo de este proyecto era identificar biomarcadores que se detectaran en muestras de suero y/o biopsias que pudieran ser útiles para i) el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad y ii) para predecir la respuesta a la quimioterapia (Figura 1).

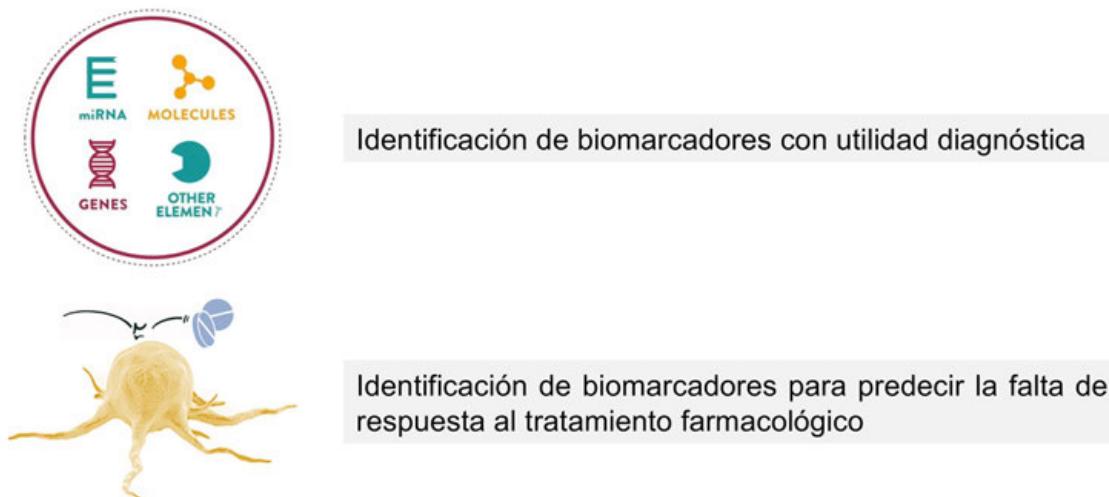


Figura 1. Representación esquemática de los objetivos del proyecto.

Resultados

Identificación de biomarcadores con utilidad diagnóstica/seguimiento

Análisis metabolómico en muestras de suero obtenidas al diagnóstico para la identificación de biomarcadores con utilidad en el diagnóstico temprano del PDAC y en el diagnóstico diferencial con dCCA.

Se seleccionaron muestras de suero de 62 pacientes con PDAC, 45 con dCCA, 53 con enfermedades benignas del páncreas (quistes y pancreatitis) y 45 sujetos control procedentes del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y del Hospital Universitario Donostia de San Sebastián. Se llevó a cabo un análisis metabolómico que identificó 467 metabolitos en suero, principalmente lípidos y aminoácidos. Se obtuvo un modelo que combinaba 10 metabolitos (aminoácidos, lípidos y esteroides) que mostró una buena capacidad para distinguir sujetos con tumores de los que no tenían tumores, con una sensibilidad del 75%, una especificidad del 81% y un área bajo la curva (AUC) de 0,86 (Figura 2). Los resultados fueron mejores que los obtenidos con el CA 19-9.

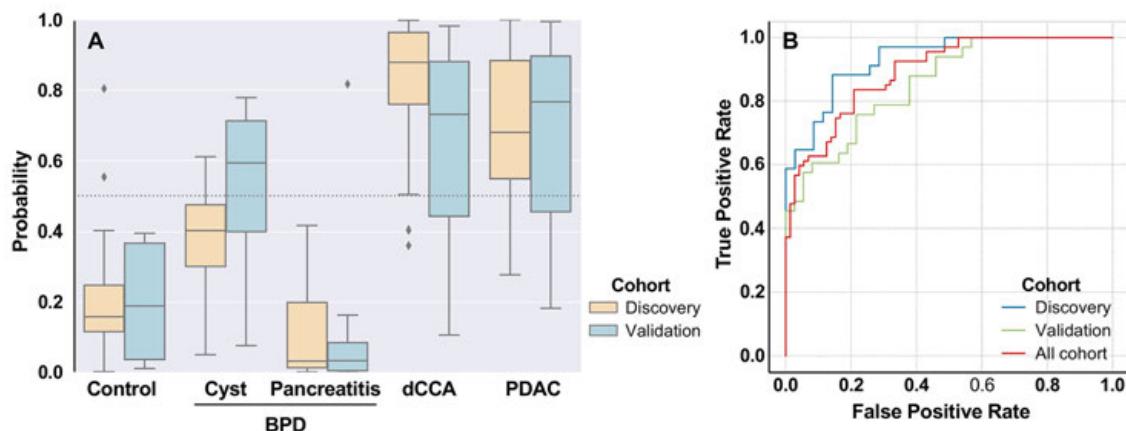


Figura 2. Capacidad de predicción diagnóstica del modelo logístico en tumores localizados en la cabeza del páncreas (dCCA+PDAC) frente a no tumores (Control+BPD). (A) Diagramas de cajas mostrando la probabilidad de detectar cada grupo como tumores. (B) Área bajo la curva (AUC) en cohortes de descubrimiento y validación y considerando ambas cohortes.

En la comparación entre ambos tumores localizados en la cabeza del páncreas, evaluamos el modelo descrito en un estudio previo que incluía 9 metabolitos más el marcador tumoral CA 19-9. Los resultados obtenidos fueron un AUC de 0,80, una sensibilidad del 70% y una especificidad del 85%; unos valores ligeramente más bajos que los obtenidos en el primer estudio, pero mejores que los del CA 19-9. En el futuro, está previsto incluir parámetros clínicos en el modelo para ver si mejora la capacidad diagnóstica, ya que es clave identificar el tipo de tumor para que el manejo de los pacientes sea el óptimo.

- Estudio de la utilidad de metabolitos en el seguimiento de la evolución mediante el análisis al diagnóstico y un mes tras la extirpación de los tumores. Relación con la respuesta radiológica.

En relación con la utilidad de estos metabolitos para seguir la respuesta de los pacientes a los tratamientos, seleccionamos 10 pacientes con PDAC y 10 con dCCA de los que se disponía de suero obtenido antes de la cirugía y un mes después de la cirugía. Después de realizar el estudio metabolómico encontramos cambios profundos en el perfil metabolómico antes y después de la cirugía, que incluían alteraciones en los metabolitos seleccionados por permitir diferenciar pacientes con tumores y enfermedades benignas y también en muchos otros metabolitos. Sin embargo, el análisis de los resultados sugería que los cambios tan grandes observados se debían en gran parte a la propia cirugía, ya que no encontramos relación en función de que tras la extirpación del tumor hubiera presencia o ausencia de enfermedad residual macroscópica o microscópica en los márgenes quirúrgicos. Nos planteamos en el futuro hacer análisis al menos 3 ó 6 meses tras la cirugía, cuando los cambios en el metabolismo debidos a la cirugía y al proceso de recuperación del paciente hayan pasado, y realizar asociaciones entre los metabolitos seleccionados y la presencia/ausencia de enfermedad residual determinada por radiología.

A continuación, decidimos poner a punto un método para medir por HPLC-MS los 12 mejores metabolitos. Como se puede observar en la figura 3, tras numerosas pruebas conseguimos un método que en menos de 10 minutos nos permitía separar los picos correspondientes a cada metabolito.

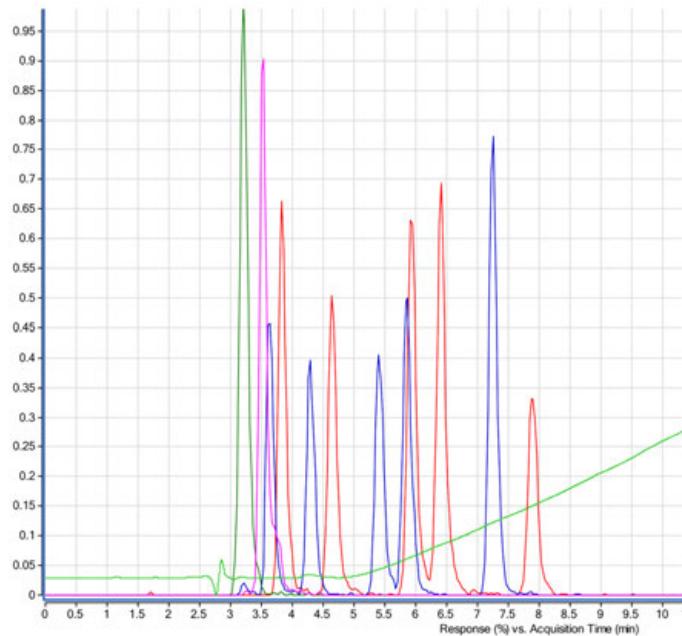


Figura 3. Cromatograma obtenido al inyectar la misma cantidad de una mezcla de 12 moléculas seleccionadas por sus valores de especificidad y sensibilidad para discriminar PDAC y dCCA.

Este método se probó en muestras de 15 pacientes de cada grupo experimental (PDAC, dCCA, quistes, pancreatitis crónica y sujetos control). Aunque los resultados han sido moderadamente satisfactorios para distinguir entre PDAC y dCCA, el método permite discriminar a los pacientes con tumores de los que tienen enfermedades benignas del páncreas o sujetos controles, y confirma que es posible seleccionar un panel de metabolitos tras unos análisis metabolómicos caros y complejos y poner a punto un método de detección más sencillo para realizar en laboratorios clínicos.

Identificación de biomarcadores para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico

- Determinación de la expresión de genes de quimiorresistencia en biopsias de PDAC mediante TLDAs.

Llevamos a cabo la determinación de la expresión del RNAm de 94 genes relacionados con mecanismos de quimiorresistencia en 32 muestras de tumores de pacientes con PDAC tratados con quimioterapia (10 clasificados como respondedores y 22 no respondedores) mediante RT-qPCR utilizando TLDAs. Las tarjetas microfluídicas o TaqMan Low Density Arrays son placas que permiten realizar 384 reacciones de PCR al mismo tiempo, ya que cada uno de los pocillos contiene una sonda Taqman a para el gen de interés. El uso de TLDA tiene varias ventajas sobre la PCR convencional: utiliza un menor volumen de cDNA y es un método sensible, fiable y rápido. La figura 4 muestra una imagen de TLDAs y los resultados de 8 muestras en los genes implicados en dos de los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) estudiados: MOC-1, genes relacionados con la entrada y expulsión de fármacos en las células tumorales y MOC-2, genes que codifican a enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos. Los cambios en estos genes condicionan los niveles de fármacos en el interior celular y, por lo tanto, la respuesta farmacológica a gemcitabina/nab-paclitaxel o folfirinox.

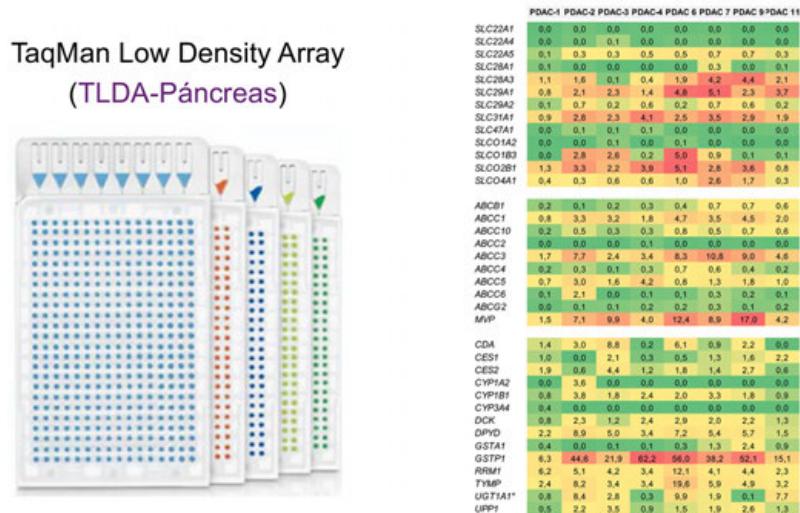


Figura 4. Imágenes de tarjetas microfluídicas (izquierda) utilizadas para determinar la expresión de genes relacionados con quimioresistencia implicados en la captación, el eflujo y el metabolismo de fármacos. A la derecha se muestran los niveles de expresión del RNAm en muestras de tumores de pacientes con PDAC que respondieron o no al tratamiento farmacológico con gemcitabina/nab-paclitaxel o folfirinox.

Encontramos cambios importantes en genes que codifican proteínas que participan en la captación de fármacos, como SLC28A3 y SLC29A1, que codifican para los transportadores de nucleósidos CNT3 y ENT1, respectivamente, en transportadores de aniones orgánicos, como SLCO1B3 y SLCO1B1 (OATP1B3 y OATP1B1). Entre las bombas de eflujo destacaron cambios en los niveles de expresión de ABCC1, ABCC3 y MVP, que codifican para las proteínas asociadas con resistencia MRP1, MRP3 y la major vault protein1 o LRP1, respectivamente. Respecto a las enzimas del metabolismo, los cambios más importantes se observaron en GSTP1, que codifica para la enzima glutatión S transferasa 1. Además se determinaron genes que codifican las dianas de los fármacos, las enzimas reparadoras del daño en el DNA, y proteínas que participan en vías de apoptosis/supervivencia.

- Correlación de los niveles de proteínas implicadas en quimiorresistencia y la respuesta radiológica

Puesto que la expresión a nivel de RNAm no siempre correlaciona con los niveles de proteína y, en el caso de las proteínas transportadoras, además de que haya expresión, deben de estar correctamente localizadas en la membrana plasmática de las células tumorales para que hagan su función de forma adecuada, llevamos a cabo estudios de inmunohistoquímica en cortes de tejido de parafina de muestras de biopsias de pacientes con PDAC utilizando anticuerpos específicos. Disponíamos de información de los tratamientos farmacológicos recibidos y de la respuesta determinada por análisis radiológicos cada 3 meses. La figura 5 muestra una representación de la obtención de muestras de parafina y unas imágenes representativas de la expresión de una de las proteínas transportadoras estudiadas, MRP3, que hemos demostrado que tiene un papel importante en el transporte de 5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino [20]. No observamos niveles elevados ni cambios de expresión entre respondedores y no respondedores en ABCG2, que codifica para BCRP y transporta gemcitabina [21], y los cambios en MRP1 podrían contribuir a la respuesta a nab-paclitaxel. Los resultados más relevantes fueron que los niveles elevados de expresión de MRP3 se asociaban con una pobre respuesta a folfirinox y con menor supervivencia global.

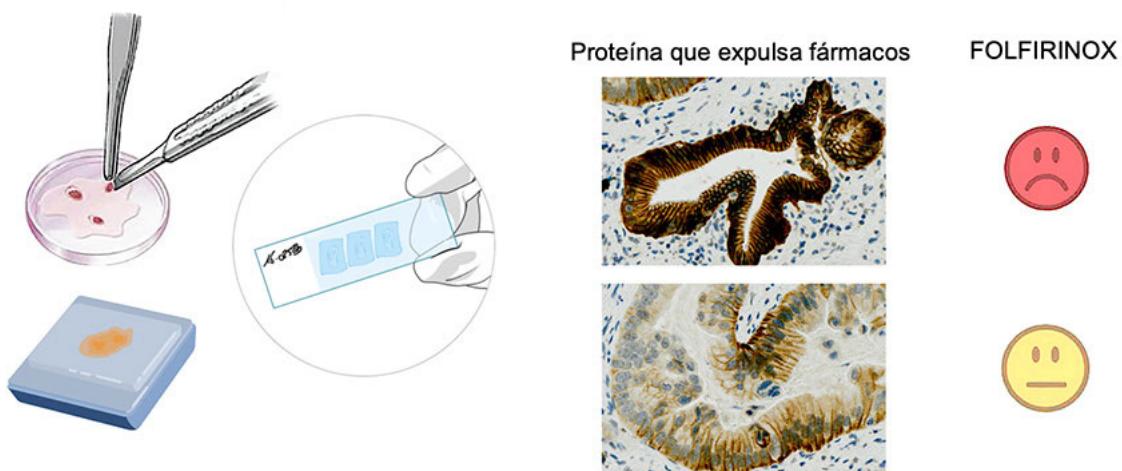


Figura 5. Representación esquemática de la obtención de muestras de biopsias de tumores y su procesamiento para la obtención de cortes de parafina (izquierda) e imágenes representativas de un caso con elevada expresión y otro con baja expresión de MPR3 en muestras de pacientes con PDAC.

Conclusiones

Este proyecto representa un avance significativo hacia una medicina de precisión en el tratamiento del cáncer de páncreas. En concreto:

- Para detectar antes y tratar mejor; la posibilidad de diagnosticar el cáncer en sus fases iniciales mediante un análisis de sangre puede marcar una gran diferencia en la supervivencia.
- Evitar tratamientos ineficaces; saber si un paciente responderá o no a un tratamiento permite ahorrar tiempo y reducir efectos secundarios innecesarios.
- Diseñar tratamientos personalizados; el análisis de la sangre permite hacer un seguimiento del tumor sin necesidad de nuevas biopsias invasivas.
- Acercar la investigación a la clínica; los métodos desarrollados buscan ser fácilmente integrables en hospitales públicos, facilitando su adopción masiva.

Bibliografía

- 1 - De Angelis R et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014; 1: 23-34.
- 2 - Rahib L, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014; 74: 2913-21.
- 3 - Maisonneuve P & Lowenfelds AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol.* 2015; 44: 186.
- 4 - Michaud DS et al. Physical activity, obesity, high and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 2001; 286: 921.
- 5 - Lucenteforte E et al. Alcohol compsumtion and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol.* 2012; 23: 374.
- 6 - Boone BA et al. Serum CA 19-9 response to neoadjuvant therapy is associated with outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2014; 21: 4351-4358.
- 7 - Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence-based appraisal. *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3: 105-19.
- 8 - Khan SA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012; 61: 1657-69.
- 9 - Ethun CG, et al. Distal cholangiocarcinoma and pancreas adenocarcinoma: are they really the same disease? A 13-institution study from the US extrahepatic biliary malignancy consortium and the central pancreas consortium. *J Am Coll Surg.* 2017; 224: 406-413.

- 10 - Gutiérrez ML, Corchete L, Teodosio C, Sarasquete ME, del Mar Abad M, Iglesias M, Esteban C, Sayagues JM, Orfao A, Muñoz-Bellvis L. Identification and characterization of the gene expression profiles for protein coding and non-coding RNAs of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Oncotarget*. 2015; 6: 19070-86.
- 11 - Macias RIR, Banales JM, Sangro B, Muntané J, Avila MA, Lozano E, Perugorria MJ, Padillo FJ, Bujanda L, Marin JJG. The search for novel diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018; 1864: 1468-1477.
- 12 - Arbelaitz A, Azkargorta M, Krawczyk M, Santos-Laso A, Lapitz A, Perugorria MJ, Erice O, Gonzalez E, Jimenez-Agüero R, Lacasta A, Ibarra C, Sanchez-Campos A, Jimeno JP, Lammert F, Milkiewicz P, Marzoni M, Macias RIR, Marin JJG, Patel T, Gores GJ, Martinez I, Elortza F, Falcon-Perez JM, Bujanda L, Banales JM. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2017; 66: 1125-1143.
- 13 - Banales JM, Iñarrairaegui M, Arbelaitz A, Milkiewicz P, Muntané J, Muñoz-Bellvis L, La Casta A, Gonzalez LM, Arretxe E, Alonso C, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Santos-Laso A, Avila MA, Martínez-Chantar ML, Bujanda L, Marin JJG, Sangro B, Macias RIR. Serum metabolites as diagnostic biomarkers for cholangiocarcinoma, hepatocellular carcinoma, and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2019; 78: 547-562.
- 14 - A Novel Serum Metabolomic Profile for the Differential Diagnosis of Distal Cholangiocarcinoma and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.
Macias RIR, Muñoz-Bellvis L, Sánchez-Martín A, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, Gutiérrez ML, La Casta A, Alonso C, González LM, Avila MA, Martinez-Chantar ML, Castro RE, Bujanda L, Banales JM, Marin JJG. A novel serum metabolomic profile for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers* 2020; 12: 1433.
- 15 - Urman JM, Herranz JM, Uriarte I, Rullán M, Oyón D, González B, Fernandez-Urién I, Carrascosa J, Bolado F, Zabalza L, Arechederra M, Alvarez-Sola G, Colyn L, Latasa MU, Puchades-Carrasco L, Pineda-Lucena A, Iraburu MJ, Iruarrizaga-Lejarreta M, Alonso C, Sangro B, Purroy A, Gil I, Carmona L, Cubero FJ, Martínez-Chantar ML, Banales JM, Romero MR, Macias RIR, Monte MJ, Marín JJG, Vila JJ, Corrales FJ, Berasain C, Fernández-Barrena MG, Avila MA.. Pilot multi-omic analysis of human bile from benign and malignant biliary strictures: a machine-learning approach. *Cancers* 2020; 12: 1644.
- 16 - Zeng S et al. Chemoresistance in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4504.
- 17 - Marin JJ, Monte MJ, Blazquez AG, Macias RI, Serrano MA, Briz O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014; 35: 1-10.
- 18 - Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RI, Serrano MA, Grañé-Boladeras N, Muñoz-Bellvis L, Alvarez L, Sangro B, Pastor-Anglada M, Marin JJ. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mo Pharm* 2012; 6: 1693-1704.

- 19 - Al-Abdulla R, Perez-Silva L, Lozano E, Macias RIR, Herraez E, Abad M, Segues N, Bujanda L, Briz O, Marin JJG. Sensitizing gastric adenocarcinoma to chemotherapy by pharmacological manipulation of drug transporters. *Biochem Pharmacol* 2020; 171: 113682.
- 20 - Asensio M, Briz O, Herraez E, Perez-Silva L, Espinosa-Escudero R, Bueno-Sacristan D, Peleteiro-Vigil A, Hammer H, Pötz O, Kadioglu O, Banales JM, Martinez-Chantar ML, Avila MA, Macias RIR, Efferth T, Marin JJG, Lozano E. Sensitizing cholangiocarcinoma to chemotherapy by inhibition of the drug-export pump MRP3. *Biomed Pharmacother*. 2024; 180: 117533.
- 21 - Ortiz-Rivero S, Peleteiro-Vigil A, Abete L, Lozano E, Hammer HS, Giacomo SD, Abad M, Boix L, Forner A, Reig M, Macias RIR, Pötz O, Marin JJG, Briz O. Sensitization of cholangiocarcinoma cells to chemotherapy through BCRP inhibition with β -caryophyllene oxide. *Biomed Pharmacother*. 2024; 170: 116038.



Beca 2021 (Básica)

Carmen Guerra:

Doctorado en Microbiología e Inmunología en la La Dra Guerra es farmacéutica y bióloga molecular con más de 30 años de experiencia en investigación en biología molecular, y más de 20 años dedicados específicamente al estudio del cáncer de páncreas. Obtuvo su doctorado en 1994 en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), donde estudió los mecanismos moleculares que regulan el tejido adiposo marrón bajo la supervisión de las doctoras Margarita Fernández y Manuel Benito.

Tras finalizar su doctorado, realizó una estancia postdoctoral en The Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.) en el laboratorio del Dr. Leslie P. Kozak. Allí, desarrolló modelos de ratón modificados genéticamente para investigar la base genética de la obesidad.

Desde 1998, la Dra. Guerra ha sido una integrante clave del laboratorio del Dr. Mariano Barbacid en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), donde su investigación se ha centrado principalmente en la tumorigénesis impulsada por Ras, con un enfoque especial en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de modelos de ratón genéticamente modificados que reproducen el cáncer de páncreas humano. Estos modelos han sido esenciales para elucidar los mecanismos moleculares de iniciación y progresión tumoral, así como para desarrollar y validar nuevas estrategias terapéuticas en entornos preclínicos.

TITULO:

Nueva estrategia terapéutica: estroma e inmunoterapia.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Carmen Guerra

Introducción

El cáncer de páncreas, conocido como adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), es uno de los tipos de cáncer más agresivos y con peor pronóstico. En los últimos años, mientras que otros tipos de cáncer han mostrado mejoras en detección precoz y tratamiento, el PDAC sigue aumentando en incidencia y mortalidad. A menudo se diagnostica en etapas avanzadas, cuando las posibilidades de tratamiento curativo son muy limitadas.

Una de las características más distintivas del PDAC es su microambiente tumoral, que está formado no solo por células tumorales, sino también por una red compleja de otras células y sustancias, entre ellas el llamado "estroma tumoral". Este estroma actúa como una barrera que protege al tumor, dificulta el acceso de los medicamentos y ayuda al tumor a evadir el sistema inmunitario. Por ello, consideramos que es esencial cambiar el enfoque del tratamiento para incluir estrategias que actúen sobre este estroma.

Objetivos del proyecto

Este proyecto tuvo como objetivo principal investigar una nueva estrategia terapéutica basada en modificar el estroma tumoral para hacerlo más vulnerable a los tratamientos, especialmente a la inmunoterapia. Nos centramos en una sustancia llamada ácido hialurónico (AH), que se encuentra en grandes cantidades en el PDAC y que creemos juega un papel clave en la protección del tumor. Los objetivos específicos fueron:

- Estudiar el papel del ácido hialurónico en la progresión del tumor.
- Evaluar si su eliminación puede facilitar la acción del sistema inmune.
- Comprobar si combinar esta estrategia con inmunoterapia mejora la eficacia del tratamiento.
- Analizar qué tipos de células estromales (como fibroblastos o macrófagos) están implicadas en esta interacción.

Metodología

Utilizamos modelos de ratón modificados genéticamente que reproducen fielmente el desarrollo del cáncer de páncreas en humanos. Estos modelos nos permiten estudiar el comportamiento del tumor en un entorno muy similar al real.

Específicamente, eliminamos de forma selectiva los genes responsables de producir ácido hialurónico (Has1, Has2 y Has3) en distintas células del estroma. De esta forma, conseguimos eliminar el ácido hialurónico de los tumores (Figura 1). A continuación, analizamos el crecimiento del tumor, la estructura del estroma, la presencia de células inmunes, y la respuesta al tratamiento con inmunoterapia.

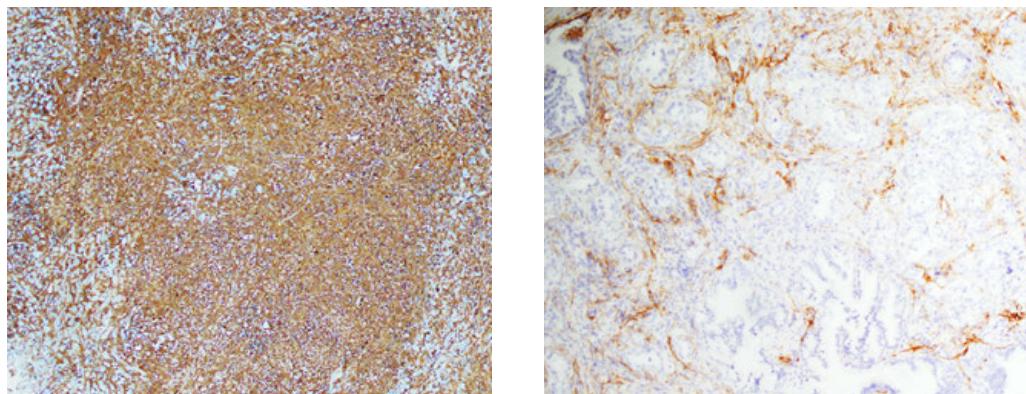


Figura 1: tumores de ratón con (imagen de la izquierda) y sin (imagen de la derecha) ácido hialurónico (tinción marrón).

Resultados principales

Nuestros experimentos revelaron varios hallazgos importantes:

- **Progresión más lenta** de los tumores en ausencia del ácido hialurónico, y por lo tanto, aumento significativo de la supervivencia (Figura 2).

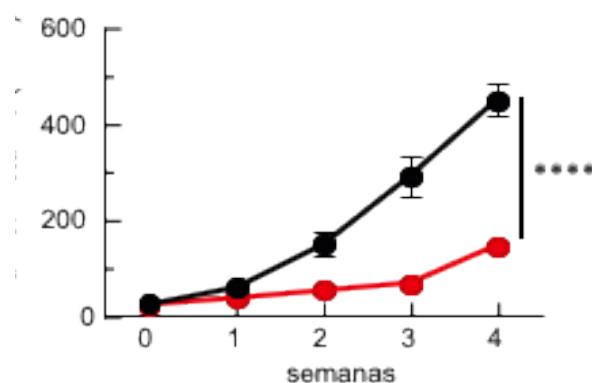


Figura 2: Crecimiento de tumores de ratón seguidos por ecografía. Tumores con ácido hialurónico (símbolo negro; 8 ratones), tumores sin ácido hialurónico (símbolo rojo; 7 ratones). Resultado estadísticamente muy significativo (****).

- **Reducción del estroma:** La eliminación del ácido hialurónico provocó una disminución del colágeno, componentes clave del estroma (Figura 3). Esto hizo que el entorno del tumor fuera menos denso y más accesible.
- **Activación del sistema inmunitario:** Por primera vez observamos que, al eliminar el ácido hialurónico, se facilitaba la entrada de linfocitos CD8+, que son células inmunes encargadas de destruir las células cancerosas (Figura 3).
- **Mejora del efecto de la inmunoterapia:** Al combinar la eliminación del AH con inmunoterapia, los tumores respondieron mejor, mostrando menor tamaño y mayor infiltración inmune.
- **Macrófagos reprogramados:** Observamos que los macrófagos (células del sistema inmune que pueden ayudar o dificultar el control del tumor) cambiaban su comportamiento tras la reducción del AH, pasando a un estado más activo contra el tumor.

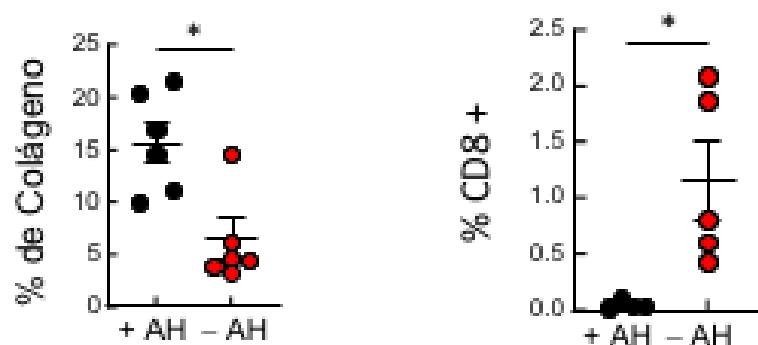


Figura 3: A nivel histológico se observan importantes cambios en los tumores en ausencia del ácido hialurónico (-AH; símbolos rojos) como son, una disminución significativa del colágeno y un incremento de los linfocitos CD8+.

Conclusiones

Nuestros resultados apoyan una nueva visión del tratamiento del cáncer de páncreas: en lugar de centrarse exclusivamente en matar las células tumorales, también debemos modificar su entorno, especialmente el estroma.

La eliminación del ácido hialurónico se presenta como una estrategia prometedora para "abrir" el tumor al sistema inmunitario y hacer que terapias como la inmunoterapia, que hasta ahora no habían sido efectivas en PDAC, puedan funcionar.

Impacto del proyecto

Este proyecto proporciona una base científica para nuevas combinaciones terapéuticas que podrían aplicarse en ensayos clínicos en un futuro cercano. El cáncer de páncreas es una enfermedad con muy pocas opciones terapéuticas efectivas, y nuestros hallazgos podrían representar un punto de inflexión al incluir estrategias dirigidas al estroma y al sistema inmune.

Además, este trabajo contribuye a un mejor entendimiento de cómo el microambiente tumoral afecta la progresión del cáncer y la respuesta al tratamiento, abriendo nuevas líneas de investigación.

Futuras líneas de investigación

- Explorar la eliminación de AH en combinación con otros tratamientos dirigidos a genes oncogénicos como EGFR o Raf1. También en combinación con la inmunoterapia y los inhibidores de Kras.
- Estudiar la eliminación de AH en tumores desarrollados con otras alteraciones, y que por lo tanto presenten diferente composición del estroma: modelos de ratón con otras mutaciones de Kras y otros genes supresores de tumores (P16/P19, Smad4,..).
- Realizar estudios más detallados sobre el papel de los diferentes tipos de células del estroma. Se realizarán estudios de secuenciación de RNA de célula única (scRNASeq).
- Desarrollar marcadores que permitan predecir qué pacientes podrían beneficiarse de esta estrategia.



Beca 2021 (Clínica)

Octavio Caba Pérez:

El Investigador Principal del proyecto, el Doctor Octavio Caba Pérez, profesor Titular e investigador del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada, desarrolla su actividad investigadora en el campo del diagnóstico precoz del ADP. Su investigación ha recibido financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III y de la Junta de Andalucía, debido a la cantidad y calidad de sus resultados, y a las patentes y publicaciones que posee en este campo.

Su compromiso con la investigación traslacional le ha llevado a participar en 6 contratos de investigación con la industria farmacéutica destacando los realizados con las empresas Roche Farma S.A. para el estudio del ADP y el grupo nacional de Tratamiento de Tumores Digestivos.

TITULO:

Diagnóstico precoz del adenocarcinoma de páncreas mediante la detección de IRAK3 y CLEC4D en biopsia líquida.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Octavio Cabá Pérez

Antecedentes:

1. Adenocarcinoma de páncreas.

Actualmente, el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) representa una de las neoplasias más mortales, manteniendo unas tasas de incidencia y mortalidad inquietantemente cercanas. Recientemente se ha reportado que en el año 2017, hubo un total de 448.000 casos nuevos de ADP en todo el mundo y el número de muertes debidas a esta patología se ha multiplicado por más de 2, pasando de 196.000 en 1990 a 441.000 (Pourshams et al., 2019).

Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica, en España representó la tercera causa de muerte por cáncer en 2017, llegando a diagnosticarse en 2019, más de 8.000 nuevos casos. A pesar de las mejoras alcanzadas en su diagnóstico y tratamiento, y nuestra creciente comprensión de los complejos eventos moleculares subyacentes al ADP, la tasa de supervivencia a 5 años sigue siendo preocupantemente baja, alrededor del 5% (McGuigan et al., 2018).

Actualmente, la resección quirúrgica es la única opción curativa para estos pacientes, mejorando la tasa de supervivencia a 5 años del 5% al 25% (Satyananda et al., 2019). Sin embargo, dada la falta de síntomas específicos en las primeras etapas de esta enfermedad y su naturaleza agresiva, la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados con cáncer avanzado, cuando el tumor ya no es resecable (Brunner et al., 2019). Esta situación expone la insuficiencia de las estrategias de detección disponibles actualmente para el ADP en una etapa temprana y de mayores opciones de curación.

2. Biopsia líquida para la detección de marcadores tumorales.

El estudio de las células mononucleares de sangre periférica (en inglés, PBMC) se ha propuesto en los últimos años como un posible marcador indirecto de diversas enfermedades, entre las que se pueden incluir la epilepsia (Zhand et al., 2018), Alzheimer (Li et al., 2017), diabetes (Christodoulou et al., 2019) y patologías malignas (Shi et al., 2018; Xie et al., 2018), entre otras muchas.

Desde hace tiempo se sabe que los marcadores tumorales basados en la determinación de un patrón de expresión génica en PBMC presentan un elevado potencial diagnóstico, especialmente si consideramos que el mecanismo que subyace a esta expresión diferencial es el reconocimiento y la evasión de la célula tumoral de nuestro sistema inmune (Liew et al., 2006).

Baine et al. realizaron los primeros estudios en biopsia líquida procedente de pacientes con cáncer de páncreas y demostraron la existencia de modificaciones en la expresión de un total de 383 genes, al compararlos con sujetos sanos control. También en este campo, Huang et al. describieron la existencia de un perfil génico con expresión específica en PBMC de pacientes con cáncer de páncreas asociado a diabetes, y que podría usarse para diferenciarlos de individuos sanos.

El estudio en PBMC también ha servido a nuestro grupo para demostrar la existencia de un perfil de expresión génica que se correlacionó significativamente con la presencia de rash cutáneo inducido por erlotinib en pacientes con ADP irrecesable, y que podría usarse como indicador pronóstico en los mismos (Caba et al., 2016).

Con estos antecedentes, **estudios realizados por nuestro grupo de investigación habían demostrado la existencia de un patrón de expresión génica diferencial** en PBMC de pacientes con ADP irrecesable respecto a sujetos sanos controles. En dicho trabajo, el perfil génico obtenido también se validó en un estudio ciego posterior mediante PCR a tiempo real (Caba et al., 2014). Además, **estos resultados se corroboraron en otro estudio**, donde se analizaron los niveles de expresión génica en diferentes poblaciones de pacientes con ADP y mediante dos plataformas de microarrays diferentes. Los resultados mostraron como muchos de los genes ya propuestos como marcadores de ADP aparecían diferencialmente expresados en ambos tipos de microarrays (Irigoyen et al., 2018).

3. IRAK3 y CLEC4D como biomarcadores de ADP.

Como ya se ha comentado anteriormente, nuestro grupo de investigación había demostrado la existencia de ciertas modificaciones en la expresión génica de PBMC en pacientes con ADP comparados con sujetos sanos control, destacando la combinación de los genes **IRAK3 y CLEC4D, que alcanzó una sensibilidad del 86% y especificidad del 100%** a la hora de discriminar entre ambas poblaciones (Caba et al., 2014).

IRAK3 es un gen relacionado con la modulación del sistema inmune, mediando en el desarrollo de la tolerancia a células cancerígenas en monocitos (Jain et al., 2014). El aumento del nivel de expresión de IRAK3 incrementa ciertas citoquinas y moléculas mediadoras, actuando como un regulador negativo de la inmunidad innata (Freihat et al., 2019). Por su parte, el producto del gen CLEC4D es un receptor endocítico implicado en la unión a antígenos y en su procesamiento y posterior presentación a las células inmunes (Miyake et al., 2015). Este gen ya fue incluido por Marshall et al., en un panel de 7 marcadores para discriminar pacientes de cáncer colorectal de sanos usando muestras de sangre, mostrando una eficiencia del 71% y sensibilidad del 72%.

En conclusión, nuestro proyecto se presentaba como el desarrollo, a nivel clínico, de los resultados previos ya obtenidos por nuestro grupo de investigación. A la vista de los **prometedores resultados obtenidos previamente**, nuestra finalidad es corroborar, en una población de pacientes con ADP resecable, la utilidad del perfil de expresión génica de IRAK3 y CLEC4D en biopsia líquida como marcador para el diagnóstico precoz del ADP.

Investigador principal (IP):

El IP del proyecto, el Dr. Octavio Caba, profesor Titular e investigador del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada, desarrolla su actividad investigadora en el campo del diagnóstico precoz del ADP. Su investigación ha recibido financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III y de la Junta de Andalucía, debido a la cantidad y calidad de sus resultados, y a las patentes y publicaciones que posee en este campo.

Su compromiso con la investigación traslacional le ha llevado a participar en 6 contratos de investigación con la industria farmacéutica destacando los realizados con las empresas Roche Farma S.A. para el estudio del ADP y el **grupo nacional de Tratamiento de Tumores Digestivos**. Además, ha sido IP en 2 proyectos competitivos regionales con la misma temática (Proyectos 2GREIB y Campus CEIBioTic). Los resultados de su investigación se han publicado en diferentes revistas internacionales del Q1, previa protección mediante diferentes patentes (P201930559, P201330897, P201330896).

El presente proyecto de investigación se desarrolló, por un lado, en el CIBM de la Universidad de Granada, con amplia experiencia en el avance del conocimiento, el desarrollo y la innovación en Biomedicina. Además, participaron en el proyecto los servicios de Oncología Médica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, del Hospital del Parque Tecnológico de la Salud y del Hospital de Baza, todos en Granada.

Hipótesis de trabajo y objetivos:

Hipótesis de trabajo: La detección del perfil de expresión de los genes IRAK3 y CLEC4D en PBMC de pacientes con ADP resecable permitirá el diagnóstico precoz de esta patología.

Objetivo general: Determinar en biopsia líquida de pacientes con ADP resecable el nivel de expresión de los genes IRAK3 y CLEC4D como método para poder realizar un diagnóstico precoz de esta enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Comparar la expresión diferencial de los genes IRAK3 y CLEC4D en biopsia líquida de pacientes con ADP resecable en relación a sujetos sanos, analizando el perfil de dichos marcadores tumorales mediante PCR a tiempo real y PCR digital.
2. Realizar, en una nueva cohorte de pacientes, un estudio ciego del perfil de expresión de los genes IRAK3 y CLEC4D en biopsia líquida para determinar su eficiencia, sensibilidad y especificidad diagnóstica.
3. Estudiar las diferencias a nivel de la expresión génica de IRAK3 y CLEC4D al comparar pacientes de ADP resecable frente a pacientes con ADP metastásico.
4. Relacionar el perfil de expresión génica diferencial de IRAK3 y CLEC4D en pacientes con ADP resecable con las variables clínico-patológicas y de supervivencia de los mismos.

Material y métodos:**Diseño del estudio:**

Estudio de casos y controles, multicéntrico, y de base hospitalaria en atención especializada de Oncología Médica.

Población de estudio:

Pacientes con ADP resecable antes cualquier tipo de tratamiento. Población de referencia: fue la población atendida en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), el Hospital del Parque Tecnológico de la Salud (PTS) y el Hospital de Baza (HB), todos en Granada.

Además, se incluyeron pacientes con patología de ADP metastásicos y 2 poblaciones de sujetos con patología pancreática no maligna, pacientes con pancreatitis crónica y con diabetes tipo 2. Por último se reclutó sangre de una población control pareada, sin patología pancreática ni tumoral previa.

El análisis del perfil de expresión génica de todas estos grupos de sujetos se realizó por RNASeq con la empresa Novogene y total RNA.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de ADP confirmado histológica o citológicamente, con enfermedad resecable.
2. Edad superior a 16 año
3. Estado funcional de Karnofsky igual o superior a 50; 4) Expectativa de vida superior a 2 meses.

Criterios de exclusión:

1. Contraindicación física o psicológica para tratamiento
2. Embarazo o lactancia
3. Otro diagnóstico de cáncer en los últimos 5 años
4. Presencia o sospecha de alergia.

Sujetos sanos:

Muestras procedentes de sujetos sanos, de características similares a la de los pacientes de ADP, sin patología pancreática ni tumoral previa, suministrados por el Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz.

1. Reclutamiento y estudios en pacientes:

Previa obtención del consentimiento informado, se recopilaron los historiales clínicos de los pacientes junto con los datos demográficos, exposición previa a tabaco y patologías previas. Además, se recogió la confirmación anatomopatológica.

2. Toma de muestras de sangre periférica:

Extracción de sangre periférica (20 c.c.) de pacientes con ADP resecable en el servicio de Oncología Médica del HUVN, PTS, HB, previa al inicio del tratamiento, mediante el uso de tubos Blood RNA (PaxGene). Las muestras obtenidas en cada sede fueron enviadas al CIBM mediante mensajería en estos tubos que aseguran la estabilidad del ARN. Además, se procedió a la obtención de muestras de sujetos sanos que actuarán como control.

3. Obtención de ARN total de sangre periférica: Para ello se utilizó el kit Blood RNA (PreAnalytix).

4. La calidad del ARN se comprobó mediante el bioanalizador 2100 Bioanalyzer (Agilent). Sólo con las muestras con un RIN ≥ 8.0 se procedió a generar las diferentes librerías genómicas de ADNc a partir de 1 μ gr de las muestras mediante el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

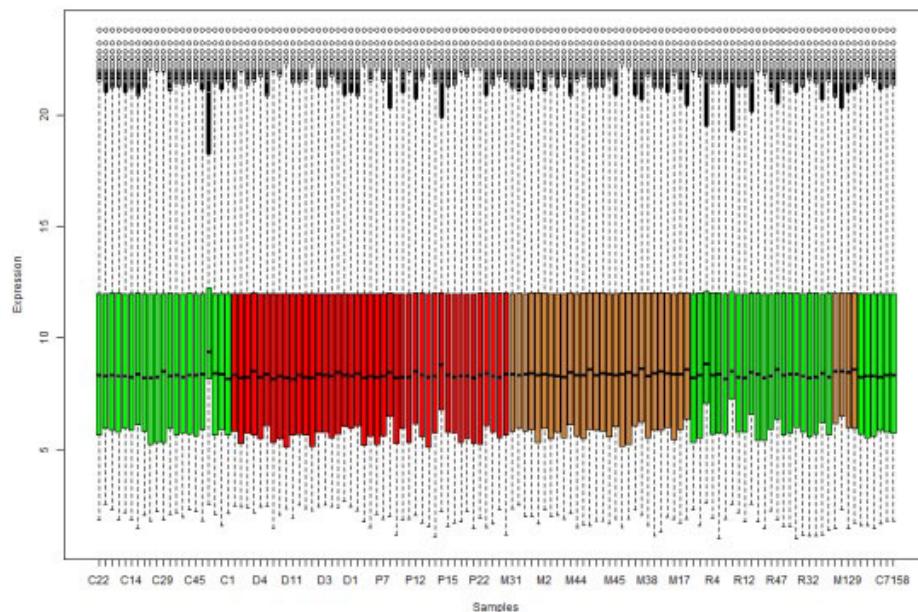
5. RNASeq y total RNA.

Resultados:

Los resultados obtenidos en el presente proyecto se muestran de manera muy breve y superficial, ya que los mismos están pendientes de protección mediante la correspondiente patente, y posterior publicación en diferentes revistas internacionales de impacto.

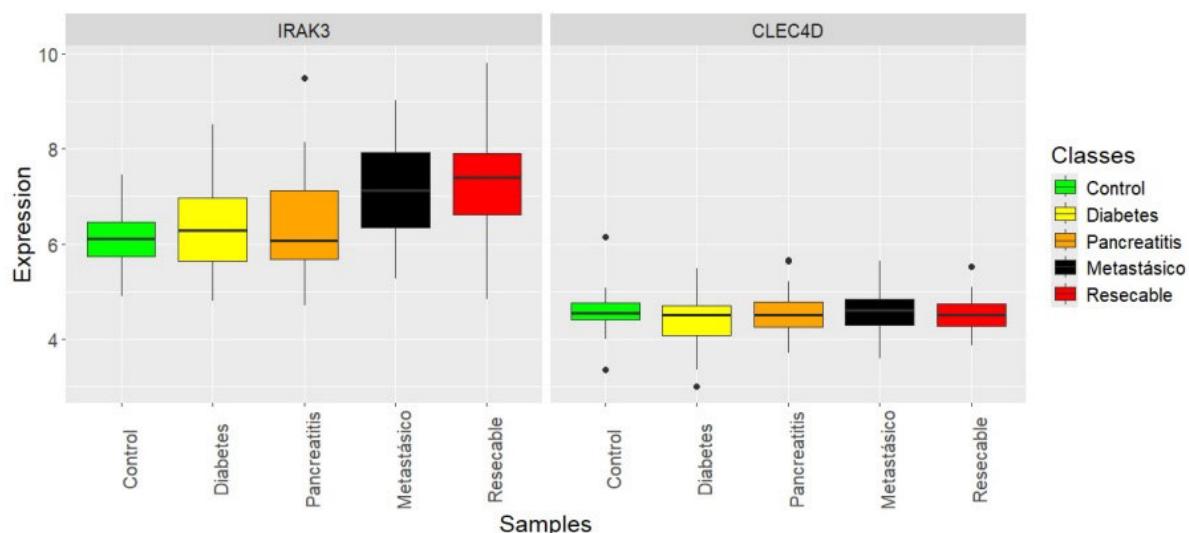
El análisis de outliers nos permitió comprobar como solo una muestra control (C45) debía ser descartada de los futuros estudios por su comportamiento (figura 1).

Figura 1. Análisis de outliers con toda las muestras obtenidas.



Con respecto al análisis de los 2 genes problema originalmente planteados en el estudio, se observó como el gen IRAK3 sí seguía presentando diferencias significativas de expresión en los grupos de cáncer frente a los que no tenían patología pancreática maligna, aumentando su expresión. Sin embargo, muy importante, esta diferencia no se observó al comparar el grupo de ADP resecable frente al metastásico. Por el contrario, el análisis de la expresión del gen CLEC4D mostró como no existía ninguna diferencia significativa al comparar los diferentes grupos entre ellos, lo que nos hizo descartar este gen para los estudios siguientes

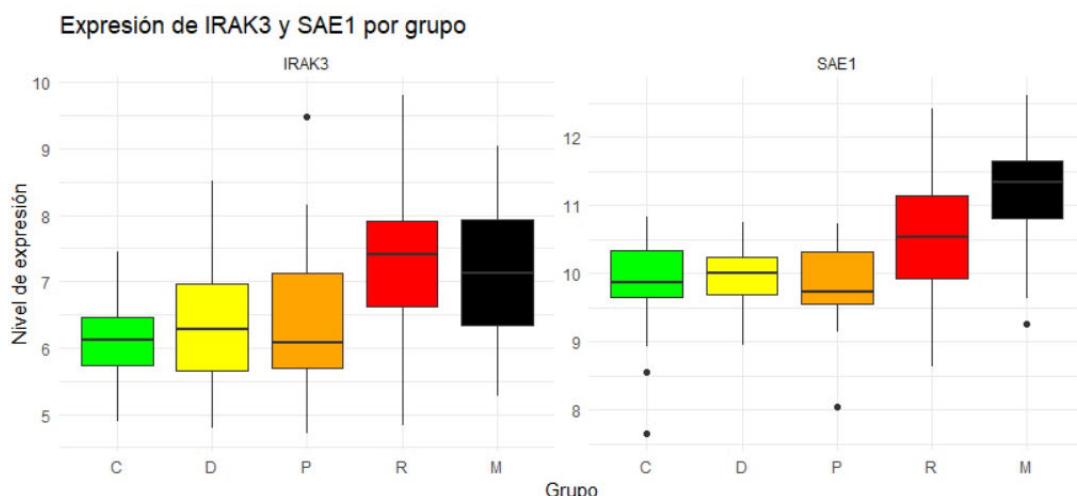
Figura 2. Niveles de expresión de los genes IRAK3 y CLEC4D en los diferentes grupos de pacientes..



Estos resultados tan prometedores respecto al gen IRAK3, nos han hecho avanzar en la búsqueda de una posible huella en sangre periférica, que nos permita diferenciar pacientes con patología tumoral pancreática frente a los que no la tienen. Para ello, mediante el uso de los algoritmos “Random Forest” (RF) y de “Relevancia Mínima y Máxima Redundancia” (mRMR), hemos seleccionados aquellos genes que, junto con el gen IRAK3, contribuyen de manera más neta a diferenciar entre los diferentes grupos estudiados.

De este modo, hemos observado como el gen SAE1 aparece también sobreexpresado en las clases de cáncer de páncreas frente a las clases no tumorales, y además presenta una monotonía sanos<resecables<metastásicos por lo que es un magnífico candidato. Este gen ha sido recientemente propuesto como factor clave pro-carcinogénico que aparece sobreexpresado en PAD, y provoca la alteración del ciclo celular mediado por el gen FOXA1 (Chen et al. 2025). Por sí solos, la expresión de estos 2 genes forman una huella con capacidad para distinguir entre los 5 grupos propuestos de un 83% de acierto y una sensibilidad del 70%.

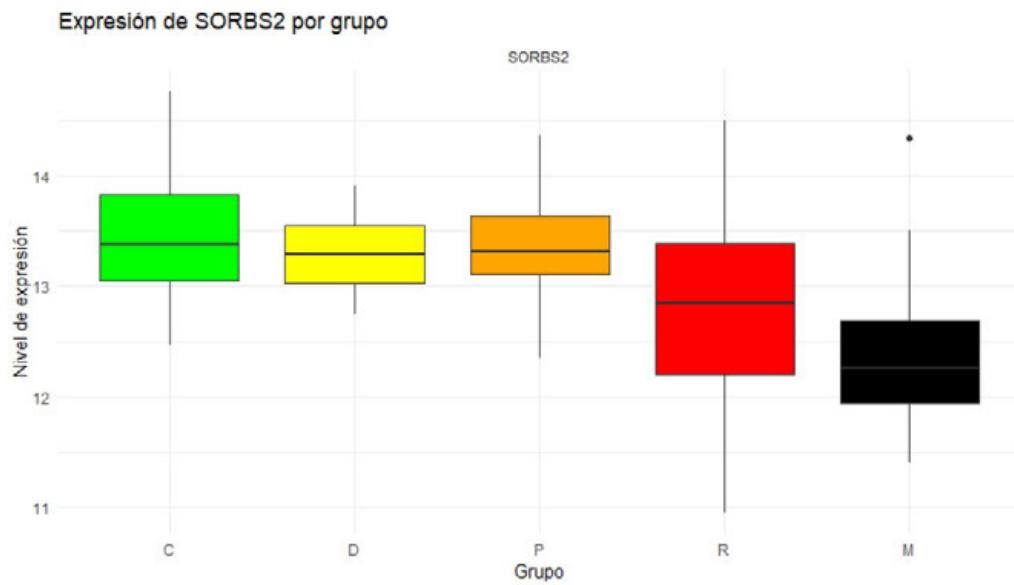
Figura 3. Niveles de expresión de los genes IRAK3 y SAE1 en los diferentes grupos de pacientes.



El tercer gen propuesto para esta huella fue SORBS2. La adición de este gen a la huella propuesta nos permitió, en el caso de la comparativa cáncer frente a no cáncer, subir del 83 al 84% de acierto, la sensibilidad se mantuvo en el 70%, y mejoró muy ligeramente la especificidad al 94%. Estos datos parecen deberse a que SORBS2 aporta información redundante al algoritmo de clasificación.

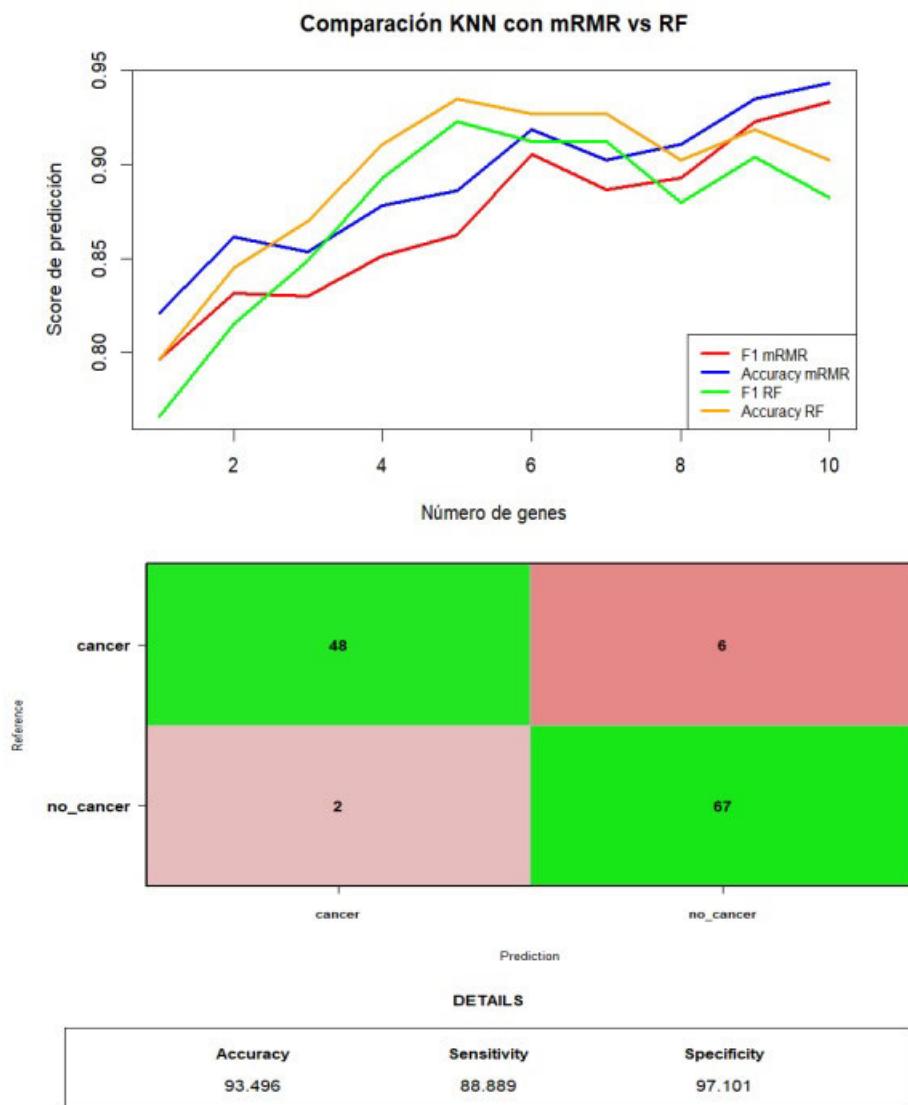
Al menos entrenando sólo con estos 3 genes, las mejoras respecto a usar sólo los 2 primeros fueron mínimas, existiendo una correlación de Pearson de -0.8 entre SAE1 y SORBS2, lo que demuestra que tienen comportamientos inversos bastante marcados en las muestras. Este último gen ya fue propuesto como actor clave en la regulación de la migración de las células pancreáticas y tumorigenidad, apareciendo como bajoreexpresado en sujetos con ADP (Taieb et al. 2008).

Figura 4. Nivel de expresión del gen SORBS2 en los diferentes grupos de pacientes.



Finalmente, si esta huella de 3 genes propuesta es complementada con 3 genes extra, hemos llegado a obtener una huella genética con una capacidad de acierto de un 93%, una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97% para distinguir sujetos con ADP de los que no la presentaban.

Figura 5. Valores alcanzados para la huella de 6 genes propuesta.

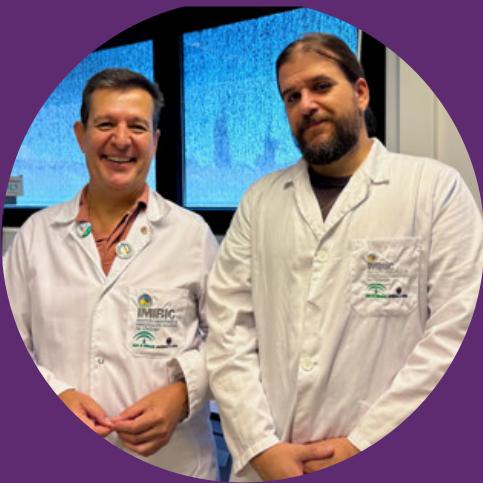


Bibliografía:

- Baine MJ, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. PLoS One. 2011;6(2):e17014.
- Brunner M, et al. Current Clinical Strategies of Pancreatic Cancer Treatment and Open Molecular Questions. Int. J. Mol. Sci. 2019;20:pii:E4543.
- Cabá O, et al. Transcriptional Profiling of Peripheral Blood in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients Identifies Potential Diagnostic Biomarkers. Digestive Diseases and Sciences 2014;59:2714-20.

- Caba O, et al. Identification of gene expression profiling associated with erlotinib-related skin toxicity in pancreatic adenocarcinoma patients. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;311:113-116.
- Chen Y, et al. SAE1 May Play a Pro-Carcinogenic Role in Pancreatic Adenocarcinoma: A Comprehensive Study Integrating Multiple Pieces of Evidence. *IET Syst Biol.* 2025 Jan-Dec;19(1):e70017.
- Christodoulou MI, et al. Blood-based Analysis of type-2 Diabetes Mellitus Susceptibility Genes Identifies Specific Transcript Variants With Deregulated Expression and Association With Disease Risk. *Sci Rep.* 2019;9:1512.
- Freihat LA, et al. IRAK3 Modulates Downstream Innate Immune Signalling Through Its Guanylate Cyclase Activity. *Sci Rep.* 2019;9:15468.
- Huang H, et al. Novel blood biomarkers of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus identified by peripheral blood-based gene expression profiles. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(7):1661-9.
- Irigoyen A, et al. Integrative multi-platform meta-analysis of gene expression profiles in pancreatic ductal adenocarcinoma patients for identifying novel diagnostic biomarkers. *Plos One* 2018;13(4):e0194844.
- Jain A, et al. IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol.* 2014;5:553.
- Li L, et al. Identification of Molecular Alterations in Leukocytes From Gene Expression Profiles of Peripheral Whole Blood of Alzheimer's Disease. *Sci Rep.* 2017;7:14027.
- Liew CC, et al. The Peripheral Blood Transcriptome Dynamically Reflects System Wide Biology: A Potential Diagnostic Tool. *J Lab Clin Med.* 2006;147:126-32.
- Marshall KW, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;126:1177–1186.
- McGuigan A, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J. Gastroenterol.* 2018;24:4846- 4861.
- Miyake Y, et al. C-Type Lectin Receptor MCL Facilitates Mincle Expression and Signaling Through Complex Formation. *J Immunol.* 2015;194:5366-74.
- Pourshams A, et al. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990- 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019;4:934-947.
- Satyananda V, et al. Advances in Translational Research and Clinical Care in Pancreatic Cancer: Where Are We Headed? *Gastroenterol. Res. Pract.* 2019;2019:7690528.

- Shi J, et al. Gene Expression Signature for Detection of Gastric Cancer in Peripheral Blood. *Oncol Lett.* 2018;15:9802-9810.
- Taieb D, et al. ArgBP2-Dependent Signaling Regulates Pancreatic Cell Migration, Adhesion, and Tumorigenicity. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4588-96.
- Xie H, et al. Multi-parameter Gene Expression Profiling of Peripheral Blood for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2018;24:371-378.
- Zhand A, et al. Expression Analysis of GRIN2B, BDNF, and IL-1 β Genes in the Whole Blood of Epileptic Patients. *Neurol Sci.* 2018;39:1945-1953.



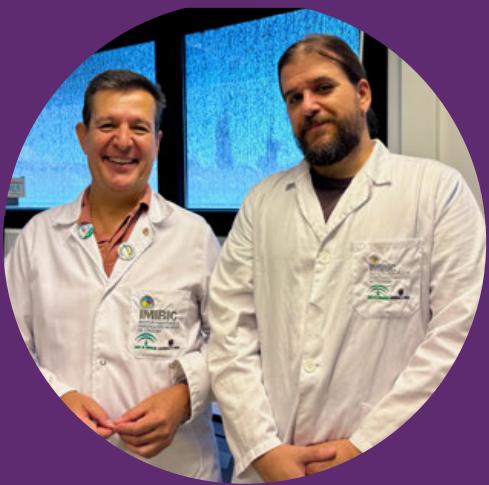
Beca 2022 (Básica)

Alejandro Ibáñez-Costa y Justo P. Castaño

El Dr. Justo P. Castaño es Catedrático de Biología Celular en la Universidad de Córdoba (UCO) y dirige el grupo de investigación Hormonas y Cáncer en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Licenciado y doctorado en Ciencias Biológicas en la UCO, completó su formación con una beca Fulbright en la Medical University of South Carolina, Charleston, EE. UU.

Su investigación se centra en los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al cáncer de páncreas y los tumores neuroendocrinos (TNE), con especial énfasis en el splicing alternativo de ARN, la biología del ARN y la señalización neuropéptido-receptor.

Es autor de más de 250 publicaciones y posee varias patentes. Es editor jefe de la revista Endocrine Oncology, participa activamente en diversas sociedades científicas (GETNE, SEEN, ESE, ENETS) y ha supervisado a más de 40 estudiantes de máster y doctorado.



Beca 2022 (Básica)

Alejandro Ibáñez-Costa y Justo P. Castaño

El Dr. Alejandro Ibáñez-Costa es Profesor Permanente Laboral de la Universidad de Córdoba (UCO) e investigador emergente del grupo Hormonas y Cáncer del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Se licenció en Biología, realizó el Máster en Investigación Biomédica Traslacional y el Doctorado en Biomedicina en la UCO.

Durante el doctorado, se formó como endocrinólogo molecular, con el objetivo de identificar biomarcadores en tumores hipofisarios, en particular variantes aberrantes de splicing de los receptores de ghrelina y somatostatina. Tras una estancia en la Queen Mary University of London (Londres, Reino Unido), se incorporó al grupo de Enfermedades Autoinmunes Inflamatorias Sistémicas del IMIBIC, donde combinó su experiencia en splicing con enfermedades autoinmunes, descubriendo la desregulación de la maquinaria de splicing en artritis reumatoide.

En 2020 se incorporó al grupo Hormonas y Cáncer del IMIBIC donde ha comenzado a desarrollar sus propias líneas de trabajo, centradas en la desregulación del proceso de splicing en cáncer de páncreas y tumores neuroendocrinos.

TITULO:

Neoantígenos derivados del splicing como dianas de la inmunoterapia en cáncer de páncreas (SplicInmuno)

INVESTIGADOR PRINCIPAL : Justo P. Castaño Fuentes

COINVESTIGADOR PRINCIPAL : Alejandro Ibáñez Costa

a) Resumen de la propuesta inicial del estudio:

Introducción.

El cáncer de páncreas tiene la tasa de supervivencia más baja de todos los cánceres en Europa, donde causa más de 95.000 muertes al año. No existe un cribado eficaz, y la mayoría de los pacientes presentan una enfermedad localmente avanzada (30 – 35 %) o metastásica (50 – 55 %) al diagnóstico.

El tratamiento sistémico seguido de radiación es una opción para los pacientes con enfermedad localmente avanzada e irresecable. Los tratamientos de quimioterapia combinada presentan una ventaja de supervivencia de 2 a 6 meses en comparación con la monoterapia. En cualquier caso, la supervivencia global sigue siendo escasa, junto con el aumento de la tasa de incidencia de entre el 0,5 – 1 % cada año, lo que hace prever que se convertirá en la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en 2030.

Pese a avances recientes, los mecanismos moleculares del cáncer de páncreas no son bien conocidos, y se necesitan nuevas vías de investigación. Una de ellas puede ser el estudio del proceso conocido como splicing. El ADN de nuestros genes se copia en moléculas de ARN que, a su vez, sirven de molde para fabricar proteínas funcionales. El ADN de los genes está compuesto por secuencias “con sentido” (codificantes o exones) que alternan con otras “sin sentido” (intrones).

Por eso, el paso de ADN a ARN requiere un procesamiento posterior, de eliminación selectiva de intrones y empalme de exones, el splicing alternativo. A través de este splicing alternativo, la célula sería capaz de generar proteínas únicas, ausentes en los tejidos normales, que pueden ser presentadas por las moléculas MHC, generándose así neoantígenos derivados del splicing, y luego reconocidas por las células T propias del paciente, que atacarían a las células tumorales, destruyéndolas.

Hipótesis:

El cáncer de páncreas presenta, relativamente, pocas mutaciones, por lo que los neoantígenos derivados de mutaciones son escasos. Además, el microambiente, es decir, las células no tumorales que acompañan a las células cancerígenas son especialmente inmunosupresoras en el caso del cáncer de páncreas. Por tanto, la hipótesis de este proyecto es que los neoantígenos derivados del splicing alternativo suponen una alternativa que permitiría el tratamiento inmunoterápico en cáncer de páncreas, que tanto éxito está teniendo en otros cánceres.

Objetivos:

Nuestro objetivo principal es potenciar la aparición, identificar y validar neoantígenos derivados del splicing en un modelo preclínico de cáncer de páncreas, que permitan el diseño de una vacuna de ARNm basada en estos neoantígenos, y trasladar los resultados a humano, utilizando las alteraciones de splicing en biopsias líquidas como marcador sustituto, que puedan predecir la respuesta.

Descripción del estudio:

Emplearemos el ratón transgénico más utilizado y que mejor modela el adenocarcinoma de páncreas, que se tratará con distintos inhibidores del proceso de splicing, para potenciar la aparición de neoantígenos. Tras estos tratamientos, se llevarán a cabo aproximaciones moleculares y biocomputacionales de última generación, para caracterizar y validar las proteínas susceptibles de exponerse como neoantígenos.

Después, se diseñará una vacuna de ARNm para que el sistema inmune de los ratones reconozca estos neoantígenos, únicos de las células tumorales. Para trasladar esto a los humanos, recogeremos biopsias líquidas y tumores de pacientes para evaluar las desregulaciones de splicing, que serán analizadas con el objetivo de encontrar neoantígenos accionables. Este estudio permitirá identificar nuevas dianas para el tratamiento inmunoterápico y así acercar la medicina de precisión al adenocarcinoma de páncreas.

b) Principales resultados

A continuación, evaluamos el efecto antitumoral de 5 moduladores de splicing en líneas celulares modelo de adenocarcinoma ductal de páncreas y la inmunotoxicidad en linfocitos citotóxicos aislados de ratón.

- **Evaluación de neoantígenos en muestras de pacientes:**

Analizamos la presencia de neoantígenos derivados del splicing mediante un enfoque biocomputacional en los datos de RNA-seq de una colección de 82 muestras de adenocarcinoma ductal de páncreas amablemente cedida por el grupo del Dr. Scarpa (ARC-Net, Fundación Universitaria y Hospitalaria de Verona, Italia). Los análisis biocomputacionales permitieron predecir neoepítopos, incluyendo su afinidad al MHC de clase I, y su capacidad para generar una respuesta inmune, es decir, su inmunogenicidad.

Esta aproximación utiliza herramientas bioinformáticas y algoritmos avanzados para predecir cómo es esta respuesta inmune atendiendo a datos de la expresión génica de los paciente

- **Preparación de datos:**

En concreto, para el análisis de los datos, las secuencias obtenidas se sometieron a un proceso de filtrado para la eliminación de adaptadores. Posteriormente, las lecturas se alinearon con el genoma de referencia humano utilizando la herramienta STAR versión 2.5.82 con la anotación UCSC RefSeq (refGene) del genoma hg19, obtenida a través de UCSC Table Browser. Para la identificación precisa de las uniones de splicing, se configuraron los parámetros de STAR de acuerdo con las especificaciones de la herramienta ASNEO. Una vez completado el alineamiento, los archivos BAM generados se ordenaron e indexaron empleando la herramienta SAMtools.

- **Análisis de datos:**

El proceso consta de diversas partes. En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* mediante seq2HLA, para determinar el genotipo del sistema antígeno leucocitario humano (HLA) específico de cada paciente. Esta herramienta permite deducir los alelos HLA mediante el alineamiento de lecturas de RNA-seq frente a una base de datos que contiene todos los alelos de este sistema. De forma simultánea se identificaron los posibles neoantígenos derivados del proceso de splicing, mediante el pipeline ASNEO, (github.com/bm2-lab/ASNEO) [1] que incluye los siguientes pasos:

1. Alineamiento de las lecturas al genoma de referencia (hg19) y detección de las uniones de splicing (splicing junctions).
2. Filtrado de las uniones de splicing identificadas en muestras de tejido sano.
3. Incorporación de las uniones de splicing no descritas en isoformas de referencia, generando nuevas isoformas y traduciéndose a proteínas.
4. Fragmentación de las proteínas generadas en péptidos de 9 aminoácidos (9-mer), la longitud óptima para la presentación por el MHC clase I, y filtrado basado en la ausencia de estos péptidos en tejidos sanos.

Así, se generaron péptidos que fueron evaluados en cuanto a afinidad al complejo HLA específico obtenido con seq2HLA, a través del software NetMHCpan-4.1

(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>).

Para finalizar, se evaluó la capacidad de generar respuesta inmune de los neopeptidos mediante una funcionalidad específica de Immune Epitope Database y Analysis Resource, seleccionando únicamente aquellos péptidos que muestran afinidad relevante a MHC de clase I y con capacidad destacada para desencadenar respuesta inmune.

Una vez establecida la lista de potenciales neoantígenos, se realizó una búsqueda exhaustiva en el genoma de referencia utilizando las herramientas Genome Browser y Ensembl, con el objetivo de identificar los eventos de splicing no canónicos responsables de la generación de los neopeptidos.

El análisis reveló que cada tumor muestra un conjunto de posibles proteínas derivadas de splicing alternativo, a las que el software asignó un rango de unión predicho a moléculas MHC-I (**Figura 1**). Hemos observado que el número de péptidos predichos depende del número de lecturas, pero se detectan péptidos de 9-mer con capacidad de unión a moléculas MHC-I en prácticamente todas las muestras, además de tener una inmunogenicidad distinta. Ninguno de estos neoantígenos había sido descrito previamente.

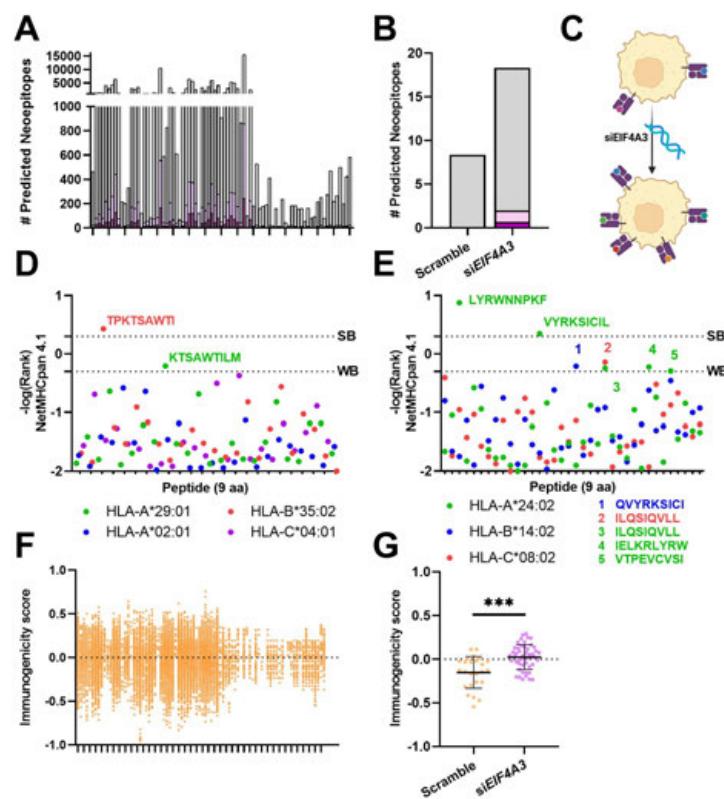


Figura 1. Detección de neoantígenos derivados de splicing en adenocarcinoma ductal de páncreas. Detección de neopeptidos derivados de splicing de datos de RNA-seq de un set de 82 muestras de cáncer de páncreas (A) y en la línea celular MIA PaCa-2 tras silenciar el factor de splicing EIF4A3 (B), los colores indican la probabilidad de que se unan de forma débil, fuerte o con poca probabilidad. Esquema del ensayo con la línea celular MIA PaCa-2 (C).

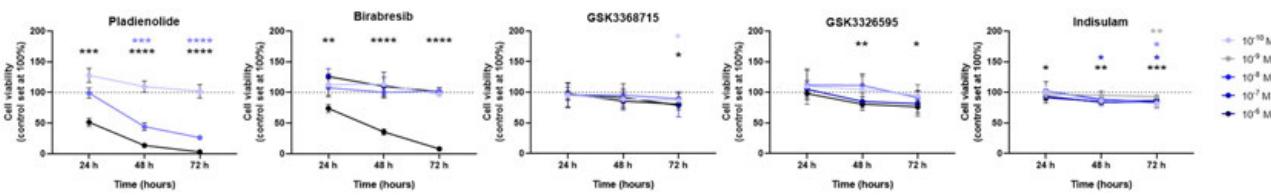
Número de péptidos de 9-mer que presentan alta (SB) o baja (WB) afinidad según el genotipo HLA en un paciente (D) a modo de ejemplo, y en las células MIA PaCa-2 (E). Puntaje de inmunogenicidad en las muestras de los pacientes (F) y en la línea celular (G), cuanto más alto es, más probabilidad es de que se activen los linfocitos T CD8+. Resultados preliminares no publicados

Evaluación de la eficacia de los inhibidores del splicing en líneas celulares.

Para los ensayos funcionales, se emplearon dos líneas celulares representativas de cáncer de páncreas, MIA PaCa-2 (CRL- 1420) y BxPC-3 (CVCL_0186), ambas adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Barcelona, España). Ambas líneas celulares exhiben mutaciones en el gen TP53, pero presentan diferencias en el grado de agresividad clínico, siendo la primera de ellas la que exhibe una mayor agresividad.

La línea celular MIA PaCa-2 de fenotipo epitelial-mesenquimatoso, presenta además una mutación activadora en el oncogén KRAS, lo que contribuye a su alta agresividad y capacidad invasiva. Se cultivó en medio DMEM 4,5 g/L de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.), suero de caballo al 2,5 % (ThermoFisher Scientific Inc., Massachusetts, EE. UU.), glutamina 2 mM al 1 % (Biowest, Nuaillé, Francia) y antibiótico/antimicótico al 1 % (Gentamicina/Anfotericina B, Sigma-Aldrich). Por otra parte, la línea celular BxPC-3, con un fenotipoepitelial se caracteriza por ser moderadamente diferenciada, con un perfil de agresividad intermedia. A diferencia de MIA PaCa-2 no presenta mutación en KRAS. Se cultivó en medio RPMI 1640 (Cytiva, Barcelona, España), suplementado con FBS al 10 % y glutamina 2 mM al 1 % (Biowest) y antibiótico/antimicótico al 1 % (Gentamicina/Anfotericina B, Sigma-Aldrich). Las líneas celulares crecieron en condiciones controladas en un incubador (37 oC y atmósfera humidificada con un 5 % de concentración de CO₂). Ambas líneas se sometieron a comprobaciones rutinarias con el fin de detectar posibles contaminaciones de micoplasma mediante PCR.

MIA PaCa-2



BxPC-3

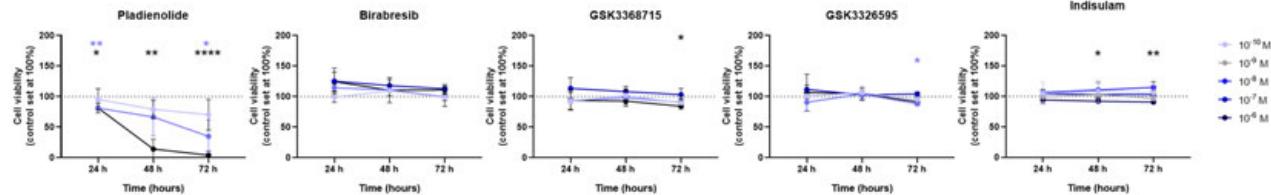


Figura 2. Efecto antitumoral de los inhibidores de splicing. Los diversos moduladores del splicing ensayados, que se dirigen a distintos elementos del spliceosoma (por ejemplo, reguladores clave de su núcleo o factores de splicing), desencadenaron pautas distintas como fármacos antitumorales

En concreto, hemos utilizado 5 inhibidores del mecanismo de splicing:

- Pladienolide-B (Biomol, Sevilla, España), inhibidor de SF3B1, elemento del core del spliceosoma, que fue utilizado en nuestro proyecto previo [2]
- Birabresib (OTX-015, MedChemExpress LLC, Monmouth Junction, NJ, EE. UU.), un inhibidor de la familia de proteínas BET (bromodomain extra terminal), que modulan el splicing alternativo de cientos de genes [3].
- GSK3368715 (MedChemExpress LLC), un inhibidor de PRMT1, una metiltransferasa que modifica residuos de arginina en proteínas, particularmente en factores de splicing [4].
- GSK3326595 (MedChemExpress LLC), un inhibidor de PRMT5, otra metiltransferasa, que tiene un papel en distintos procesos, incluyendo el ensamblaje de los ARN pequeños nucleares, esenciales en el proceso de splicing [5].
- Indisulam (MedChemExpress LLC), un inhibidor de RBM39, un factor de splicing que promueve la inclusión de exones [6].

De hecho, todos estos inhibidores, salvo el Pladienolide-B se están usando en ensayos clínicos contra diferentes tipos de cáncer sólidos o hematológicos.

Como podemos observar en la **Figura 2**, el Pladienolide-B ejerce un gran efecto antitumoral incluso a dosis bajas, sin embargo, el efecto de los demás inhibidores, que son más específicos de ciertos factores de splicing, ejercen un efecto dependiente de dosis y de línea celular.

Por ello, decidimos estudiar el efecto de estos moduladores en células inmunes.

Evaluación del efecto inmunosupresor en linfocitos T CD8+ de ratón

Los primeros ensayos se han hecho con ratones wild type, ya que hemos tenido problemas para adquirir la línea de ratón KPC (Kras^{tm1Tyj} Trp53^{tm1Brn} Tg (Pdx1-cre/Esr1^{tm1})#Dam/J). Pero ya tenemos una colonia en el animalario del IMIBIC, por lo que pronto podremos empezar con los experimentos con ellos.

En primer lugar, el bazo fue extraído por el servicio de Animalario del IMIBIC, bajo condiciones estériles y trasladado al laboratorio de cultivos celulares de nuestro grupo. Allí realizamos una dispersión mecánica, tras la cual se eliminaron los eritrocitos con un buffer de lisis. El aislamiento de linfocitos T CD8+ se llevó a cabo utilizando la tecnología de microbeads (Miltenyi Biotec; Madrid, España), utilizando un marcaje de CD8a (Ly-2), comprobando su pureza por citometría de flujo.

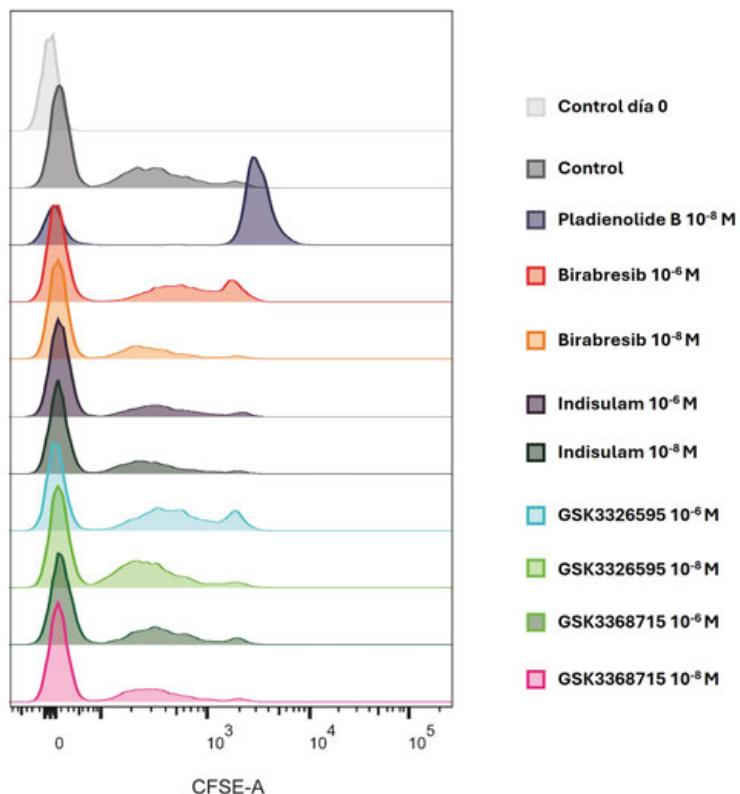


Figura 3. Efecto antiproliferativo de los inhibidores de splicing. Los diversos moduladores del splicing ensayados, que se dirigen a distintos elementos del spliceosoma desencadenaron respuestas distintas en la proliferación de los linfocitos T CD8+.

Los linfocitos T CD8+ obtenidos a partir de tejido esplénico de ratones se cultivaron en DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con suero de caballo al 2,5 % (ThermoFisher Scientific Inc.), FBS al 10 % (Sigma-Aldrich), L-glutamina 2 mM al 1 % (Biowest) y una solución de antibiótico/antimicótico al 1 % (Gentamicina/Anfotericina B; Sigma-Aldrich). Además, se añadieron 100 U/ml de IL-2 (Pepro-Tech, Londres, Reino Unido) y 2-mercaptopetanol 50 μ M (ThermoFisher Scientific Inc.) para mantener la proliferación y activación de los linfocitos T CD8+

Con el fin de conocer cómo afectan los inhibidores de splicing a la **proliferación de los linfocitos T CD8+**, se llevó a cabo un ensayo con 5-(y-6)-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster (CFSE). Las placas se incubaron durante 3 días, permitiendo la proliferación de las células bajo condiciones controladas y, transcurrido ese tiempo, se midieron los niveles de CFSE en un citómetro de flujo LSR- Fortessa a 488 nm.

El CFSE es un compuesto que va pasando a las células hijas durante la mitosis. En la Figura 3 se observan distintos perfiles. Cada pico es una generación de células, cuanto más a la izquierda, más veces se ha dividido la célula y cuantos más picos hay, más proliferación ha ocurrido. Observamos, sobre todo el Pladienolide-B, pero también las dosis altas de los otros moduladores de splicing, sobre todo birabresib y GSK3326595, el inhibidor de PRMT5, inducían un efecto antiproliferativo en los linfocitos T CD8+.

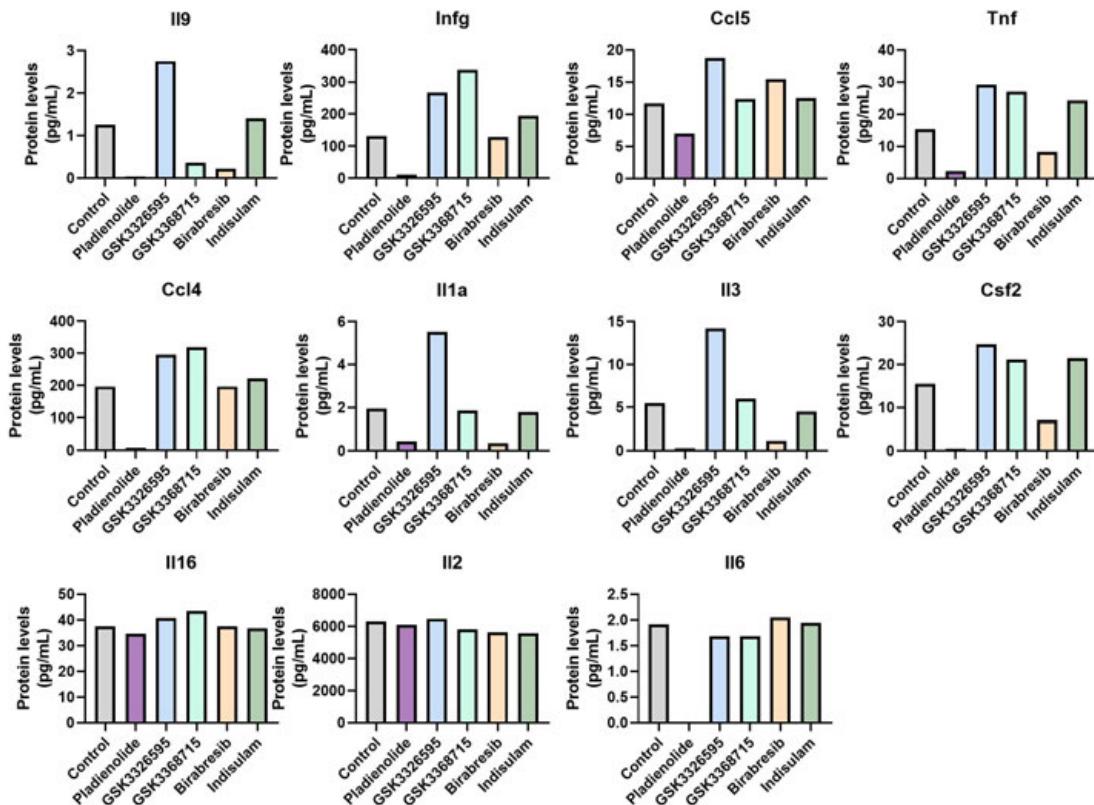


Figura 4. Efecto inmuno supresor de los inhibidores de splicing. Los distintos tratamientos alteraron la secreción de citoquinas en los linfocitos T CD8+. De las 48 citoquinas ensayadas, 11 fueron detectadas en nuestro ensayo

Por otro lado, la **cuantificación de los niveles de citoquinas** producidas por los linfocitos T CD8+ se llevó a cabo a partir del sobrenadante de los linfocitos T cultivados y el kit Olink Target 48 Mouse Cytokine (Olink Proteomics, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Con este protocolo se determinó la expresión de 48 citoquinas de ratón específicas de respuesta inmune.

En la **Figura 4** observamos una respuesta diferencial, vemos que el Pladienolide-B indujo una inmunosupresión en la mayoría de los casos. Los otros moduladores ejercieron respuestas más específicas en ciertas citoquinas. Es de destacar que el inhibidor de RBM39, indisulam, mostró unos resultados similares al control, demostrando que su efecto inmunosupresor es mínimo.

c) Problemas encontrados

La obtención de los ratones KPC ha sido más compleja de lo esperado, ya que en el proveedor tenían un microorganismo que no estaba presente en nuestro animalario, y hemos obtenido los animales gracias a una cesión de nuestro colaborador, el Dr. Bruno Sainz (Universidad Autónoma de Madrid), y estamos ampliando la colonia de animales.

Por ello, el proyecto ha ido más lento de lo esperado, así que los puntos de diseño de la vacuna de ARNm y la traslación a los pacientes están en proceso. Pretendemos terminar los experimentos in vivo y ex vivo con linfocitos T CD8+ de ratones KPC a lo largo de 2025 y 2026.

d) Bibliografía más relevante

1. Zhang Z, et al. (2020) ASNEO: Identification of personalized alternative splicing based neoantigens with RNA- seq. *Aging (Albany NY)* **12**, 14633-14648.
2. Alors-Pérez E, et al. (2021) Dysregulated splicing factor SF3B1 unveils a dual therapeutic vulnerability to target pancreatic cancer cells and cancer stem cells with an anti-splicing drug. *J Exp Clin Cancer Res* **40**, 382.
3. Maser T, et al. (2020) The MDM2 inhibitor CGM097 combined with the BET inhibitor OTX015 induces cell death and inhibits tumor growth in models of neuroblastoma. *Cancer Med* **9**, 8144-8158.
4. Fedoriw A, et al. (2019) Anti-tumor Activity of the Type I PRMT Inhibitor, GSK3368715, Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss. *Cancer Cell* **36**, 100-114 e125.
5. Shao J, et al. (2019) Discovery of 2-substituted-N-(3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2-hydroxypropyl)- 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6-carboxamide as potent and selective protein arginine methyltransferases 5 inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem* **164**, 317-333.
6. Lu SX, et al. (2021) Pharmacologic modulation of RNA splicing enhances anti-tumor immunity. *Cell* **184**, 4032-4047 e4031.
7. Oka M, et al. (2021) Aberrant splicing isoforms detected by full-length transcriptome sequencing as transcripts of potential neoantigens in non-small cell lung cancer. *Genome Biol* **22**, 9.
8. Cafri G, et al. (2020) mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J Clin Invest* **130**, 5976-5988.
9. Ibáñez-Costa A, et al. (2022) Splicing machinery is impaired in rheumatoid arthritis, associated with disease activity and modulated by anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* **81**, 56-67.



Beca 2022 (Clínica)

Óscar Pozo :

Óscar Pozo es doctor en Química por la Universitat Jaume I (Castellón) y doctor en ciencias de la salud por la Gent University (Bélgica). Dirige el grupo de investigación en Metabolómica Aplicada del Hospital del Mar Research Institute (HMRI).

Una de sus principales líneas de investigación es la búsqueda de marcadores diagnósticos mediante técnicas metabolómicas.



Beca 2022 (Clínica)

Gabriel Gil :

Gabriel Gil es doctor en Farmacia por la Universitat de Barcelona. Actualmente trabaja en el grupo de Carcinogénesis Gastroesofágica del HMRI. Su temática investigadora se centra en la identificación de biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos para tumores gastrointestinales.

En 2019, ambos investigadores unieron esfuerzos con el fin de buscar marcadores para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas mediante estrategias metabolómicas.

TITULO:

Validación de la firma metabolómica CarboSign para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Óscar Pozo

COINVESTIGADOR PRINCIPAL: Gabriel Gil

EQUIPO INVESTIGADOR: Enrique Castro, Adelaida García, Esther Llop, Rosa Peracaula, Lidia Cornejo, Ester Fort, Laura Visa, Elida Alechaga, Alex Gomez, David Fabregat, Pau Nebot

Introducción

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) es el tipo de cáncer de páncreas más frecuente. Es uno de los tumores más letales, con una supervivencia de los pacientes a los cinco años de ser diagnosticados inferior al 10%. Además, el número de pacientes que se diagnostican (incidencia) cada año está en claro aumento.

Hay dos razones por las que el cáncer de páncreas es tan mortal. La primera es que se suele detectar muy tarde, a menudo cuando ya se ha extendido a otras partes del cuerpo. La segunda es que es un tipo de cáncer muy agresivo para el que las terapias disponibles tienen una efectividad limitada una vez se ha extendido o si reaparece después de la cirugía. Estos factores combinados hacen que el cáncer de páncreas sea un desafío enorme para la medicina actual.

1.1. El diagnóstico precoz de cáncer de páncreas: un reto mayúsculo.

Se estima que un diagnóstico precoz podría aumentar 10 veces la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas. Por este motivo, disponer de pruebas de laboratorio que permitan el diagnóstico en etapas iniciales supondría un gran avance en su tratamiento y en el aumento de la esperanza de vida de los pacientes. Lamentablemente, en la actualidad no existen este tipo de pruebas, por lo que el diagnóstico requiere de pruebas sofisticadas de imagen y de la toma de muestras de tejido (biopsias), que son molestas para el paciente, costosas y que requieren de un tiempo considerable.

El único marcador disponible en la actualidad es el antígeno del cáncer 19-9 (CA19-9). Sin embargo, el test CA19-9 es poco sensible (=no detecta muchos pacientes que tienen la enfermedad) y poco específico (=resulta positivo en algunos individuos que no tienen la enfermedad) por lo que es necesario disponer de pruebas diagnósticas efectivas para el cáncer de páncreas.

1.2. Los cambios metabólicos como marcadores precoces del cáncer de páncreas.

La mayoría de las enfermedades llevan asociadas cambios bioquímicos en el organismo (inflamación, diferencias en el consumo de nutrientes etc). En el caso de los tumores en general, y el de páncreas en particular, estos cambios se caracterizan por un uso diferente de los nutrientes (metabolismo).

Si lográramos conocer de manera específica las diferencias en el metabolismo producidas por la presencia de un cáncer de páncreas, podríamos detectarlas en la sangre de los pacientes, permitiendo utilizar estos “cambios metabólicos” como “marcadores” de la presencia del tumor.

2. Hipótesis y objetivos

Este proyecto parte de la hipótesis de que la presencia de un tumor en el páncreas produce unas alteraciones metabólicas detectables incluso en las primeras etapas del tumor. En base a esta hipótesis, en nuestro laboratorio hemos identificado un grupo de siete de estas moléculas “marcadores metabólicos” (llamados en conjunto “firma CarboSign”) que son más abundantes en sueros de pacientes con cáncer de páncreas que en sueros de individuos sanos.

Estas moléculas o “marcadores” están relacionadas con el uso anormal de nutrientes por las células tumorales. La medida de la abundancia de estos marcadores en la sangre permitiría detectar el cáncer de páncreas en sus etapas iniciales, cuando el tumor todavía no ha causado síntomas y puede extirparse, posibilitando la curación del paciente. Aunque hemos validado estos marcadores en colecciones de sueros de pacientes (=cohortes) de dos hospitales diferentes, para demostrar su validez en el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas es necesario analizar un número elevado de muestras procedentes de diferentes hospitales. Es lo que se denomina “validar la firma”.

Así, este proyecto tiene como primer objetivo validar la firma CarboSign con el fin de disponer de pruebas que permitan diagnosticar la presencia de cáncer de páncreas en etapas iniciales usando muestras de sangre. Para ello nos propusimos analizar una colección de muestras de suero de pacientes con cáncer de páncreas precoz recogida por el EDRN. La Red de Investigación para la Detección Temprana (EDRN por sus siglas en inglés) es una iniciativa de colaboración liderada por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos

<https://edrn.nci.nih.gov/data-and-resources/sampleresources-sets>.

Por otra parte, los marcadores que hemos identificado podrían utilizarse para predecir la aparición del cáncer de páncreas en casos de historial de cáncer de páncreas familiar (=heredable) o en otras patologías en las que el riesgo de desarrollarlo es alto, como en el caso de las pancreatitis crónicas. Con este fin, hemos establecido un circuito para el seguimiento de personas de alto riesgo de padecer cáncer de páncreas. A estas personas se les ha incluido un análisis CarboSign en su seguimiento.

Finalmente, pretendemos que el resultado de la firma CarboSign pueda ser intuitivo y pueda ayudar al clínico en su toma de decisiones. Por este motivo pretendemos, mediante el uso de herramientas de inteligencia artificial, transformar las concentraciones de los marcadores incluidos en la firma CarboSign en una un número que indique el riesgo del paciente de padecer cáncer de páncreas.

3. Resultados y discusión

2.1. ¿Qué tal funciona la prueba CarboSign?

Se analizaron un total de 333 muestras de suero que forman parte del "EDRN Pancreatic Cancer Reference Set", la colección de muestras del EDRN relacionadas con cáncer de páncreas y que incluían muestras de pacientes con cáncer de páncreas y muestras control.

Al principio, examinamos un grupo pequeño de muestras (SubSet 1) sin saber a quiénes pertenecían (lo que llamamos "análisis ciego"). Cuando vimos que los resultados eran prometedores, recibimos el permiso para analizar dos grupos más grandes de muestras (Subsets 2 y 3).

Queríamos saber si CarboSign funcionaba para detectar el cáncer en sus primeras etapas, comparándolo tanto con personas sanas como con aquellas que tenían pancreatitis crónica (una inflamación del páncreas que a veces se confunde con cáncer). Además, necesitábamos saber si nuestra prueba CarboSign era mejor que la prueba CA19-9 (la única disponible actualmente) y/o si ambas pruebas podían ser complementarias.

En el primer grupo de muestras (SubSet 1), vimos que CarboSign era muy bueno para decir quién no tenía la enfermedad (alta especificidad), incluso mejor que la prueba estándar (CA19-9), pero no tan bueno para detectar a los que sí la tenían (baja sensibilidad). Sin embargo, cuando combinamos CarboSign con la prueba CA19-9, obtuvimos los mejores resultados. Era la combinación más efectiva tanto para encontrar a los enfermos como para descartar a los sanos. Por eso nos dieron luz verde para seguir probando en más muestras.

Tabla 1. Resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos en los tres sets de las muestras EDRN Pancreatic Cancer Reference para el diagnóstico precoz.

Prueba Utilizada	Sensibilidad	Especificidad
CA19-9 (la prueba usual)	Entre 47% y 51% (casi la mitad de las veces)	95% (casi siempre acierta)
CarboSign (nuestra nueva prueba)	Entre 32% y 42% (menos de la mitad de las veces)	Entre 92% y 95% (casi siempre acierta)
CA19-9 + CarboSign (ambas juntas)	Entre 63% y 67% (casi 2 de cada 3 veces)	Entre 87% y 90% (la mayoría de las veces acierta)

¿Qué significan estos números?

Sensibilidad: Es la capacidad de la prueba para detectar correctamente a las personas que sí tienen la enfermedad (cuanto más alto, mejor).

Especificidad: Es la capacidad de la prueba para detectar correctamente a las personas que no tienen la enfermedad (cuanto más alto, mejor).

Los resultados de los siguientes dos grupos de muestras confirmaron lo que ya habíamos visto: la combinación de CA19-9 y CarboSign sigue siendo la mejor opción para el diagnóstico temprano.

Pero, a pesar de estos resultados prometedores, el análisis de las muestras EDRN nos desveló un dato importante: como se puede ver en la Tabla 1, la capacidad de CarboSign para detectar la enfermedad (sensibilidad) en estas muestras era menor (entre 40% y 60%) de lo que habíamos visto en estudios anteriores (donde llegaba a 80%-90%). Sin embargo, su capacidad para descartar la enfermedad (especificidad) seguía siendo alta (aproximadamente 90%).

Decidimos investigar las razones detrás de estas diferencias. Uno de los posibles motivos es que en las muestras EDRN no se controló si los participantes habían comido antes de la prueba mientras que todas las muestras analizadas previamente se habían recogido en ayunas. Dado que la mayoría de las moléculas que componen la firma CarboSign están relacionadas con la manera en que nuestro cuerpo obtiene energía, pensamos que el no haber comido podría afectar la prueba. Por eso decidimos estudiar cómo influye el ayuno en los resultados de CarboSign.

2.2. El ayuno: un factor clave para CarboSign

Con el fin de evaluar la importancia del ayuno en los resultados de CarboSign, analizamos 261 muestras de personas sanas de las que disponíamos del dato de si la muestra había estado recogida en ayunas o no. Los resultados probaron que comer antes de la prueba **afecta mucho** a los niveles de las moléculas que mide CarboSign tal y como muestra la Tabla 2 y en la Figura 1.

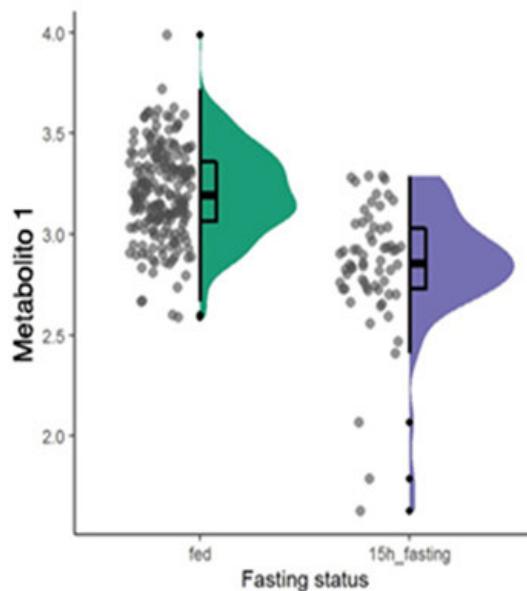
Tabla 2. Efecto del ayuno en los niveles de las moléculas (=metabolitos) que componen CarboSign

Sustancia (Metabolito)	Nivel Promedio en Ayunas	Nivel Promedio Sin Ayunas	¿Es la Diferencia Significativa? (valor p)	¿Qué Significa Esto?
Metabolito 1	2.9	3.2	Muy Significativa (<0.001)	Los niveles son notablemente más altos cuando no se ha estado en ayunas.
Metabolito 2	2.1	2.4	Muy Significativa (<0.001)	Los niveles son notablemente más altos cuando no se ha estado en ayunas.
Metabolito 3	2.2	2.4	Significativa (0.001)	Los niveles son notablemente más altos cuando no se ha estado en ayunas.
Metabolito 4	1.9	2.2	Significativa (0.008)	Los niveles son notablemente más altos cuando no se ha estado en ayunas.
Metabolito 5	3.5	3.4	No Significativa (0.12)	Los niveles son prácticamente los mismos, ya sea que se haya ayunado o no.
Metabolito 6	1.2	1.25	No Significativa (0.20)	Los niveles son prácticamente los mismos, ya sea que se haya ayunado o no.
Metabolito 7	3.7	3.7	No Significativa (0.96)	Los niveles son prácticamente los mismos, ya sea que se haya ayunado o no.

Conclusión Clave:

Para varias de estas moléculas (Metabolitos 1, 2, 3 y 4), sus niveles en la sangre cambian mucho dependiendo de si el paciente ha comido recientemente. Si no ha estado en ayunas, estos niveles tienden a ser más altos. Esto es muy importante porque significa que para que la prueba CarboSign sea lo más precisa posible, es mejor tomar las muestras cuando la persona ha estado en ayunas.

Figura 1. Efecto del ayuno en los niveles del primer metabolito de la firma CarboSign



Esta imagen, nos ayuda a visualizar lo que ya comentamos: cómo el ayuno (no haber comido antes de la prueba) influye en los niveles de una de las moléculas importantes para la prueba CarboSign. En el gráfico podemos ver que los niveles de estas moléculas son más altos cuando la persona no ha ayunado (fed, es decir, ha comido recientemente) y más bajos cuando sí ha ayunado (15h_fasting).

Esto refuerza la idea de que es importante estar en ayunas para que la prueba CarboSign dé los resultados más fiables.

Por lo tanto, desde un punto de vista metabólico, una persona con cáncer de páncreas en ayunas produce una cantidad elevada de varios metabolitos relacionados con la producción de energía. Estos metabolitos en una persona sana sólo están elevados tras la ingesta de alimentos. Por tanto, si no se controla el ayuno, los resultados de la firma CarboSign podrían llevar a confusiones.

Conclusión:

Para que CarboSign funcione lo mejor posible, **las muestras deben tomarse con la persona en ayunas**. No cumplir con este requisito puede haber hecho que los resultados de las muestras anteriores parecieran menos efectivos (menor sensibilidad) de lo que realmente son. La buena noticia es que pedir ayuno antes de una toma de muestras es algo común en los hospitales, así que no debería ser un problema para usar esta prueba en el futuro.

2.3. Mejorando la prueba CarboSign con inteligencia artificial.

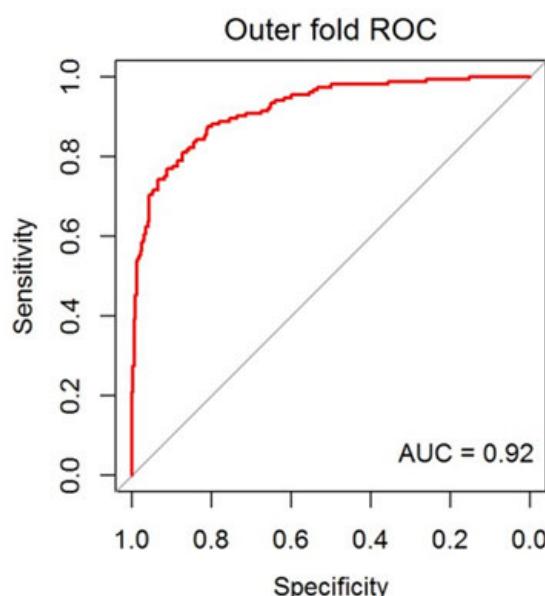
Los resultados hasta ahora nos muestran que CarboSign es útil, pero también que hay cosas que pueden afectar su precisión. Para que sea más fácil de usar y más precisa, decidimos mejorarlala con **inteligencia artificial**.

Nuestro objetivo era crear una herramienta sencilla (como una "calculadora") que los médicos pudieran usar fácilmente para obtener información útil sobre el riesgo de cáncer de páncreas en vez de utilizar un conjunto de números representando concentraciones de moléculas en sangre.

Para esto, usamos un tipo de inteligencia artificial llamado "Elastic Net Regression". Primero, seleccionamos la cantidad mínima de marcadores que conforman la prueba CarboSign para ser lo más efectiva posible. Descubrimos que con seis marcadores era suficiente y obtuvimos una fórmula que transformaba la abundancia de estos marcadores en el suero de los pacientes en un número que indica el riesgo de tener cáncer de páncreas del paciente.

Luego, probamos la capacidad de la fórmula para predecir el cáncer de páncreas. El modelo funcionó muy bien, obteniendo un área bajo de la curva ROC de 0.92 (Figura 2).

Figura 2. La "Curva de Calidad" de nuestra prueba para detectar el Cáncer de Páncreas



Esta imagen, llamada Curva ROC, es un gráfico que nos ayuda a entender cómo de buena es nuestra nueva "calculadora" para detectar el cáncer de páncreas.

Imaginemos que estamos ajustando la calculadora para decidir a partir de qué valor determinamos que el paciente "tiene cáncer" o "no tiene cáncer".

Si el número de corte es muy bajo, la calculadora dirá que casi todo el mundo tiene cáncer (detectará muchos casos reales, pero también dará muchas falsas alarmas).

Si el número de corte es muy alto, dirá que casi nadie tiene cáncer (dará pocas falsas alarmas, pero se le escaparán muchos casos reales).

La Curva ROC nos muestra todos los posibles puntos de equilibrio entre estas dos situaciones:

El eje vertical (hacia arriba) representa la "Capacidad de Detección" (cuántos casos de cáncer reales encontramos). Cuanto más arriba, mejor.

El eje horizontal (hacia la derecha) representa las "Falsas Alarmas" (cuántas veces decimos que hay cáncer cuando no lo hay). Cuanto más a la izquierda, mejor (menos falsas alarmas).

El Área debajo de la Curva (AUC) nos da una estimación global de lo exacto y preciso que es el método. El método ideal tendría una AUC de 1.0, en nuestro caso tenemos un 0,92

Lo ideal es que la curva esté lo más cerca posible de la esquina superior izquierda del gráfico. Esto significaría que la prueba es muy buena para detectar el cáncer sin dar muchas falsas alarmas.

En este caso, la curva cumple bien lo anterior, lo que significa que nuestra calculadora es efectiva para encontrar el cáncer de páncreas.

Mediante la fórmula se pudieron detectar correctamente el 87.5% de los casos de cáncer y descartar el 81% de los que no lo tenían (Tabla 3).

Tabla 3. Matriz de confusión para el modelo Elastic Net Regression

Predicción	Control	PDAC
Control	254	19
PDAC	60	133

¿Qué nos dicen estos números?

254 aciertos (arriba a la izquierda): La calculadora dijo que 254 personas estaban sanas, y realmente estaban sanas.

133 aciertos (abajo a la derecha): La calculadora dijo que 133 personas tenían cáncer, y realmente tenían cáncer.

19 fallos (arriba a la derecha): La calculadora dijo que 19 personas tenían cáncer, pero en realidad estaban sanas. Esto se conoce como "falso positivo" (una falsa alarma).

60 fallos (abajo a la izquierda): La calculadora dijo que 60 personas estaban sanas, pero en realidad tenían cáncer. Esto se conoce como "falso negativo" (un cáncer no detectado, lo cual es más preocupante).

Mediante la aplicación de esta fórmula, pudimos establecer cuatro niveles de riesgo basándonos en el valor que arroja este cálculo, tal y como se ve en la Figura 3:

- **Riesgo bajo:** Si el valor es menor a 0,25. La gran mayoría de estas personas eran sanas.
- **Riesgo moderado:** Si el valor está entre 0,25 y 0,5.
- **Riesgo alto:** Si el valor está entre 0,5 y 0,75.
- **Riesgo extremo:** Si el valor es mayor a 0,75. La gran mayoría de estas personas tenían cáncer.

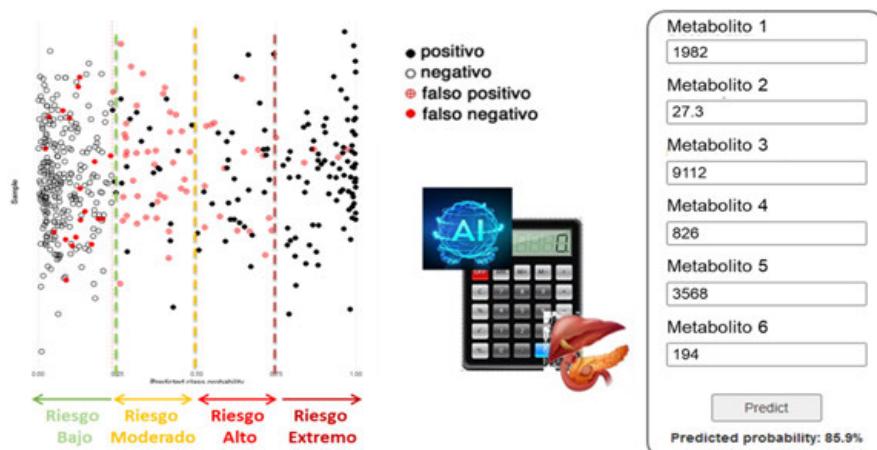


Figura 3. Entendiendo el Riesgo con Nuestra Calculadora CarboSign

Esta imagen nos ayuda a visualizar cómo nuestra "calculadora" basada en inteligencia artificial (el modelo Elastic Net Regression) clasifica a las personas, dándoles una puntuación de riesgo de cáncer de páncreas.

Imaginemos que cada punto en este gráfico es una persona, y su posición de izquierda a derecha representa la puntuación que nuestra calculadora le asigna.

El gráfico tiene tres zonas principales marcadas por unas líneas verticales:

Zona Verde (Riesgo Bajo): Estas son las personas cuya puntuación cae por debajo de 0,25 (la primera línea). La gran mayoría de las personas en esta zona son controles (sanas), lo que significa que la calculadora está diciendo correctamente que tienen un riesgo bajo de cáncer.

Zona Amarilla (Riesgo Moderado): Esta es la zona entre la primera y la segunda línea (entre 0,25 y 0,5). Aquí el riesgo es intermedio. Cuanto más cerca esté la puntuación de 0,5, mayor es el riesgo.

Zona Roja (Riesgo Alto): Es la zona entre la segunda y la tercera línea (entre 0,5 y 0,75). Aquí el riesgo es alto, aunque no extremo. Es una zona de "vigilancia".

Zona Granate (Riesgo Extremo): Estas son las personas cuya puntuación es superior a 0,75 (la tercera línea). La gran mayoría de las personas en esta zona tienen cáncer de páncreas, lo que indica que la calculadora los ha identificado correctamente con un riesgo alto.

Conclusión:

Básicamente, este gráfico muestra que nuestra calculadora hace un buen trabajo separando a las personas sanas de las que tienen cáncer. Los valores que arroja la calculadora son muy útiles para clasificar a los pacientes en cuatro niveles de riesgo claros: bajo, moderado, alto o extremo.

Con estos puntos de corte, la prueba fue muy buena: si la prueba decía "riesgo extremo", era correcta el 95% de las veces; y si decía "riesgo bajo", era correcta el 92% de las veces como se ve en la Tabla 4.

Tabla 4. Matriz de confusión para el modelo Elastic Net Regression para las muestras de riesgo bajo y elevado

Predicción	Control	PDAC
Riesgo bajo	256	21
Riesgo elevado	4	83

¿Qué tal identifica nuestra calculadora los riesgos de cáncer?

Esta tabla es como un resumen de los aciertos y errores de nuestra calculadora CarboSign cuando la usamos para clasificar muestras en las zonas de "riesgo bajo" o "riesgo elevado" de cáncer de páncreas.

¿Qué nos dicen estos números?

256 aciertos (arriba a la izquierda): La calculadora dijo que 256 personas tenían bajo riesgo (es decir, probablemente estaban sanas), y realmente estaban sanas.

83 aciertos (abajo a la derecha): La calculadora dijo que 83 personas tenían un riesgo elevado (es decir, probablemente tenían cáncer), y realmente tenían cáncer.

21 fallos (arriba a la derecha): La calculadora dijo que 21 personas tenían un riesgo elevado, pero en realidad estaban sanas. Esto es lo que llamamos una "falsa alarma".

4 fallos (abajo a la izquierda): La calculadora dijo que 4 personas tenían bajo riesgo, pero en realidad tenían cáncer. Estos son los casos más críticos, ya que no se detectó el cáncer.

Afortunadamente, este número es muy bajo.

Una de las grandes ventajas de este modelo es que nos permitió crear una **herramienta sencilla** que transforma los niveles de las moléculas en un valor de riesgo fácil de entender para los médicos, con lo que obtuvimos un primer prototipo de esta "calculadora".

2.4. Probando la calculadora CarboSign en pacientes con riesgo.

En los últimos meses, hemos empezado a usar esta nueva herramienta en pacientes que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de páncreas. Esto incluye a personas con quistes pancreáticos (IPMN), familiares de pacientes con cáncer de páncreas, personas diagnosticadas con diabetes después de los 50 años, y pacientes con pancreatitis crónica.

Hemos logrado establecer un sistema para recoger estas muestras en los hospitales y centros de salud, trabajando de cerca con enfermeras y personal médico.

Primero, analizamos 19 muestras de pacientes con IPMN (Figura 4). Tres de estos pacientes mostraron un **riesgo extremo** de cáncer de páncreas con nuestra prueba. Hicimos un seguimiento especial de ellos:

- El **paciente 431** ya tenía quistes que mostraban signos de malignidad y fue operado.
- El **paciente 425** tenía niveles altos de una proteína que se usa como marcador de cáncer (CA19-9).
- El **paciente 427** fue diagnosticado con cáncer de próstata en 2022 y está bajo seguimiento.

Esto sugiere que nuestra prueba identificó correctamente a personas con alto riesgo de cáncer o con otros tipos de tumores.

También analizamos 9 muestras de otros grupos de riesgo (familiares de pacientes, diabéticos recién diagnosticados y con pancreatitis crónica). Aunque ninguno superó el umbral de "riesgo extremo" (0,75), una de las muestras (la 447) tuvo un valor cercano (0,716), por lo que decidimos hacerle un seguimiento más de cerca. Se le hicieron pruebas de imagen, que salieron normales, y el valor de CarboSign bajó a la normalidad seis meses después. Se le seguirá monitorizando.

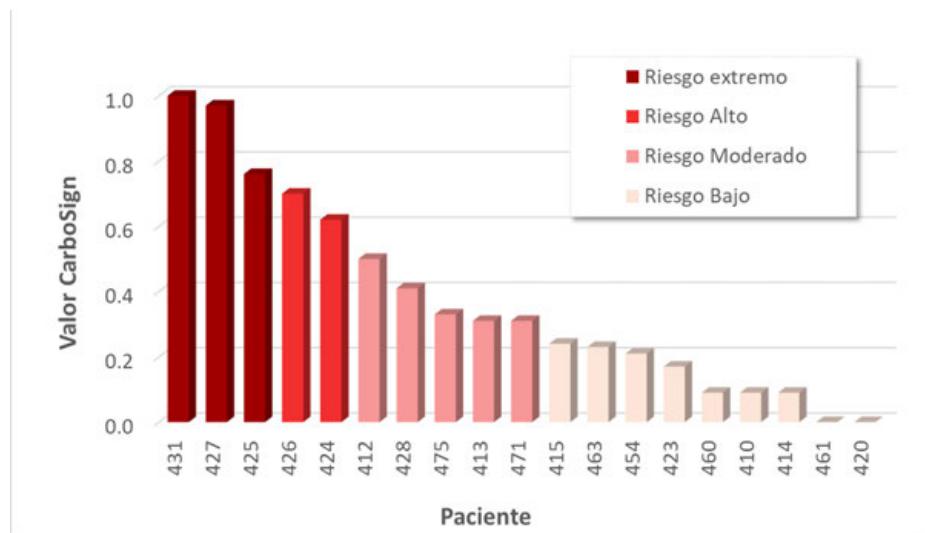


Figura 4. Aplicación de la Calculadora CarboSign en pacientes de riesgo

Esta imagen nos indica los resultados obtenidos para la firma CarboSign en pacientes con quistes pancreáticos. A los tres pacientes con Riesgo Extremo se les hizo un seguimiento especial obteniendo resultados compatibles con tumores.

2.5. Probando la calculadora CarboSign en individuos sanos, pacientes de riesgo y pacientes con cáncer de páncreas.

Para averiguar cómo se comportaba nuestra calculadora CarboSign en individuos sanos en comparación con los pacientes de riesgo de desarrollar cáncer de páncreas (pacientes con pancreatitis crónicas o quistes pancreáticos) y con muestras de pacientes con cáncer de páncreas, la utilizamos para el análisis de todas las muestras de estos grupos de las que disponíamos.

En la Figura 5 podemos ver que la calculadora predice un riesgo significativo (alto-extremo) de desarrollar cáncer de páncreas en menos del 1% de muestras de controles sanos. Este riesgo crece en los pacientes de riesgo (10-15%) y llega a detectar como positivas el 60% de las muestras de pacientes con cáncer de páncreas incluso en aquellas muestras no recogidas en ayunas. Este porcentaje llega casi al 90% (casi todas las muestras) en el caso del cáncer de páncreas precoz en las muestras tomadas en ayunas. Estos resultados confirman el prometedor funcionamiento de esta primera versión de la calculadora CarboSign.

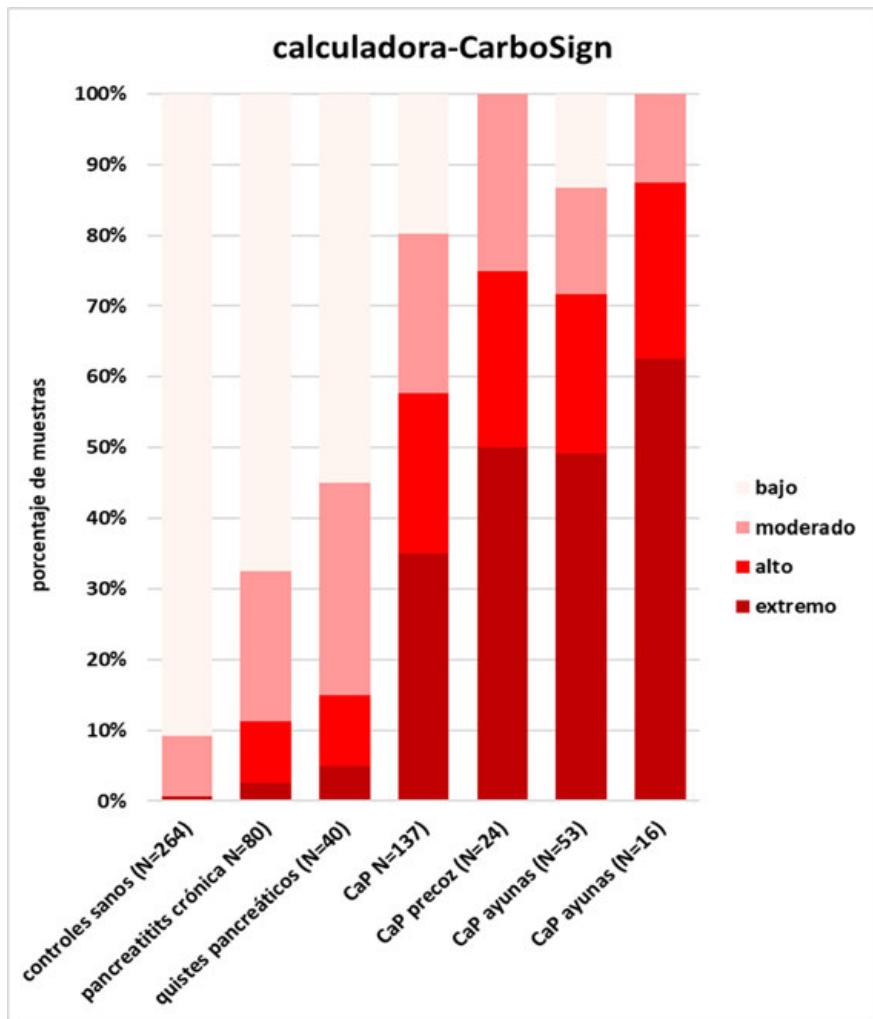


Figura 5. Entendiendo el Riesgo con Nuestra Calculadora CarboSign. (CaP, cáncer de páncreas)

4. Conclusiones

Los resultados de nuestro proyecto confirman que la prueba **CarboSign es útil para detectar el cáncer de páncreas desde en sus primeras etapas.**

También hemos descubierto que es **crucial tomar las muestras de sangre en ayunas** para que la prueba funcione correctamente. La razón por la que CarboSign pudo parecer menos efectiva en algunas de las muestras iniciales es que no se había controlado si las personas habían ayunado. Por lo tanto, necesitamos hacer más pruebas con muestras recolectadas bajo esta condición para confirmar su verdadera eficacia.

Además, hemos desarrollado una **calculadora basada en inteligencia artificial** que facilita la interpretación de los resultados de CarboSign. Esta calculadora toma los niveles de las moléculas y arroja un valor de riesgo. Un valor superior a 0.5 indica un alto riesgo mientras que un valor superior a 0.75 indica un riesgo extremo. Esta herramienta se podría mejorar aún más añadiendo otros marcadores o datos clínicos del paciente.

Finalmente, hemos logrado establecer un circuito para la recogida de muestras de personas con riesgo de cáncer de páncreas y hemos empezado a analizarlas. Aunque de momento no hemos detectado nuevos casos de alto riesgo, el seguimiento de una persona con un valor ligeramente elevado ha sido útil.

Gracias al apoyo recibido, hemos podido aprender mucho más sobre CarboSign y desarrollar un prototipo de calculadora para su uso clínico, lo que nos acerca un paso más a ofrecer una herramienta útil para el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas.

5. Próximos pasos

En los próximos años, buscaremos financiación para seguir mejorando CarboSign y llevarla a la práctica clínica. Algunas de nuestras prioridades son:

- **Validar la prueba** en más grupos de personas que hayan ayunado antes de la toma de muestras.
- **Mejorar la calculadora** añadiendo más marcadores que ya hemos identificado como importantes.
- **Añadir otros datos del paciente** a la calculadora, como los resultados de la prueba CA19-9 u otra información médica relevante.
- **Continuar analizando y siguiendo** a las personas con mayor riesgo, especialmente a los familiares de pacientes y a los que desarrollan diabetes después de los 50 años.



Beca 2023 (Básica)

Diana Rafael :

Doctora en Farmacia (PharmD, PhD), es Investigadora Principal en el VHIR, especializada en el diseño y validación preclínica de sistemas innovadores de liberación de fármacos, particularmente en cáncer. Con más de 50 publicaciones, dos patentes y la dirección de varios proyectos nacionales e internacionales, su trabajo conecta el desarrollo farmacéutico desde el laboratorio hasta la clínica, con un enfoque en la escalabilidad.

Entre otros reconocimientos, ha recibido la prestigiosa beca Marie Skłodowska-Curie y la ayuda La Caixa Junior Leader. Actualmente dirige la Unidad de Síntesis de Nanosistemas y la Unidad de Validación Preclínica In Vitro dentro de la Plataforma de Validación Funcional e Investigación Preclínica (FVPR), certificada con la ISO 9001:2015. Diana también es miembro del Comité de "Responsible Research and Innovation" en el VHIR.



Beca 2023 (Básica)

Joaquín Seras-Franzoso :

Licenciado en Biotecnología y Doctor (BSc, PhD) (2012). Desde 2015 está vinculado al grupo CB-DDT, siendo actualmente Investigador Principal y Profesor Asociado en la Universitat Autònoma de Barcelona. Su investigación ha abarcado desde el desarrollo de nanopartículas proteicas pioneras (first-in-class) para aplicaciones biomédicas, hasta la biofabricación de vesículas extracelulares como sistemas de liberación de fármacos/proteínas, así como el diseño de estrategias dinámicas de marcaje para el estudio fisiológico de subconjuntos específicos de EVs.

Sus contribuciones al campo de la nanobiotecnología, logradas a través de su participación en más de 20 proyectos nacionales e internacionales (5 de ellos como IP), han dado lugar a 2 patentes y a más de 50 publicaciones en revistas científicas de alto impacto. (h-index: 33, citaciones: 4412)

TITULO:

Nanoclustered Affimers for Targeted KRAS Ablation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

INVESTIGADORES PRINCIPALES: Diana Rafael, PharmD, PhD and Joaquín Seras-Franzoso, PhD

CENTRO DE INVESTIGACIÓN: Vall D'Hebron Research Institute (VHIR). Vall D'Hebron Hospital. Passeig de la Vall D'Hebron 119-129, 08035 Barcelona. Tel: 934893000

2. Resumen del proyecto

El cáncer de páncreas es una enfermedad devastadora con una incidencia creciente y una alta mortalidad, siendo el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) el más prevalente y que representa más del 90% de todas las neoplasias malignas de páncreas. La tasa de supervivencia relativa de los pacientes a los 5 años depende en gran medida del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, siendo de alrededor del 37 % para los estadios localizados y solo del 3 % para los estadios avanzados de la enfermedad. Los tratamientos disponibles para el cáncer de páncreas son la resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante. Desafortunadamente, solo el 10-20% de los pacientes son diagnosticados con PDAC localizado y operable.

Por lo tanto, es de suma importancia identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevas estrategias que mejoren y superen los malos resultados clínicos actuales. Alrededor del 95% de los pacientes con PDAC presentan mutaciones en un gen llamado homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten (KRAS), lo que resulta en una activación aberrante de la proteína KRAS que promueve la malignidad celular y el desarrollo de tumores.

Además, la actividad anormal de la proteína KRAS se asocia con un mal pronóstico, una baja tasa de supervivencia y resistencia a los medicamentos, siendo las proteínas mutadas de KRAS una diana terapéutica prometedora para el tratamiento eficaz de PDAC. Desafortunadamente, hasta la fecha, solo unas pocas terapias demostraron eficacia para atacar los cánceres mutados en KRAS. Creemos que la forma más eficiente y específica de lograr este objetivo es llevar al interior de las células tumorales proteínas modificadas similares a un anticuerpo pero más pequeñas y mucho más estables (afímero y/o nanocuerpo), capaces de unirse a KRAS y bloquear su activación. Este tipo de moléculas por sí solas no tienen la capacidad de entrar en las células y requieren de la ayuda de transportadores de tamaño nanométrico que protejan su integridad y permitan su entrega intracelular.

El grupo de investigación Bioquímica Clínica, Vehiculización de Fármacos y Terapia del Vall d'Hebron Instituto de Investigación (VHIR), tiene una gran experiencia en la administración intracelular de fármacos y anticuerpos utilizando nanomedicina.

En este trabajo proponemos la identificación y síntesis de nuevos afimeros y/o nanocuerpos contra KRAS para entregarlos en células tumorales mutadas en KRAS utilizando dos sistemas diferentes de nanoentrega: micelas poliméricas y vesículas extracelulares. La eficacia de ambos sistemas se probará en modelos *in vitro* e *in vivo* de PDAC. Teniendo en cuenta la experiencia y los prometedores resultados preliminares del grupo, se espera llegar a una nanoplataforma capaz de promover un tratamiento selectivo y eficaz contra PDAC mutado en KRAS.

3. Problemática

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una de las formas más agresivas y letales de cáncer. A pesar de décadas de investigación, la tasa de supervivencia a cinco años sigue siendo muy baja, en gran parte porque el diagnóstico suele ser tardío y los tumores desarrollan rápidamente resistencia a los tratamientos disponibles. Esta situación pone de manifiesto la **urgente necesidad de desarrollar nuevas terapias más eficaces y específicas**.

Uno de los principales retos terapéuticos en el PDAC es la presencia de mutaciones en el gen **KRAS**, detectadas en aproximadamente el 95 % de los casos. Estas mutaciones activan de forma constante señales que favorecen la proliferación celular, la evasión del sistema inmunitario y la diseminación del tumor (Figure 1). A pesar de ser una diana clave, **KRAS ha sido históricamente considerado un objetivo "difícil de tratar"**. Esto se debe a que su estructura molecular no presenta zonas evidentes donde pequeñas moléculas puedan unirse con eficacia para bloquear su función. Además, muchas terapias convencionales no logran penetrar el entorno tumoral denso y fibroso característico del cáncer de páncreas, lo que limita su eficacia. Por todo esto, **hay una necesidad urgente de desarrollar terapias más eficaces, específicas y menos tóxicas** para mejorar las posibilidades de curación y la calidad de vida de los pacientes.

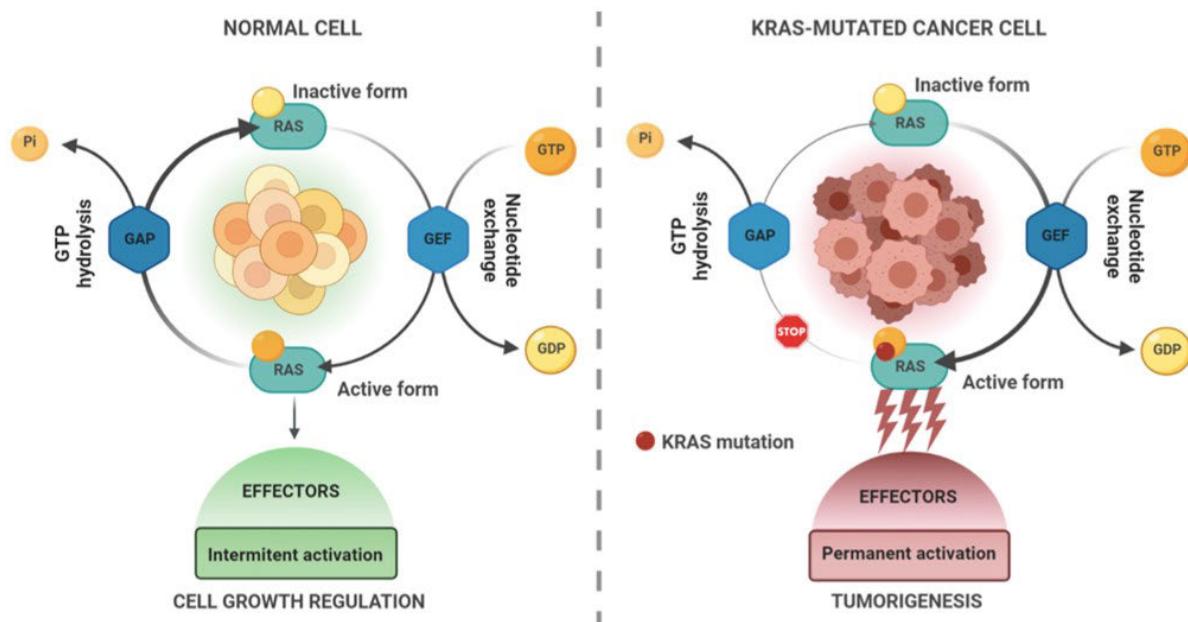


Figura 1. Representación esquemática del inicio de la tumorogénesis en células con mutaciones en KRAS. Figura extraída de Andrade, F., et al., Pharmaceutics, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15061686.

GAP – proteína activadora de GTPasa; GDP – difosfato de guanosina; GEF – factor de intercambio de nucleótidos de guanina; GTP – trifosfato de guanosina; Pi – fosfato inorgánico.

En el presente proyecto de investigación se ha trabajado en una estrategia innovadora para bloquear la acción de KRAS basada en la utilización de biomoléculas (anticuerpos, nanocuerpos y afímeros) que puedan reconocer y unirse específicamente al KRAS mutado. Estas proteínas tienen el inconveniente de sufrir una rápida degradación en el cuerpo, por lo que el presente proyecto propone la vehiculización de estas moléculas mediante sistemas basados en **nanotecnología** y así protegerlas y llevarlas al tumor de forma más eficaz.

El equipo de investigación, en la publicación Rafael, D., et al., ACS Appl Mater Interfaces, 2023 (doi: 10.1021/acsami.2c19897) han sido pioneros en el uso de micelas poliméricas, i.e. un tipo de nanopartículas hechas de polímeros anfifílicos biocompatibles y aprobados para uso humano, para la vehiculización intracelular de anticuerpos contra el KRAS, con eficacia demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de cáncer de colon y de páncreas.

Gracias a esta línea de trabajo, se están sentando las bases para una nueva generación de terapias más seguras, específicas y eficaces contra el cáncer de páncreas. El apoyo de ACANPAN ha sido fundamental para consolidar esta línea investigación y seguir explorando el potencial de este tipo de terapia.

4. Hipótesis y objetivos del proyecto

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) con mutaciones en el gen KRAS sigue siendo uno de los grandes retos no resueltos en oncología. Las terapias actuales presentan una eficacia muy limitada. Por ello, este proyecto combina biotecnología avanzada y nanomedicina para desarrollar nuevas soluciones terapéuticas frente a un tipo de cáncer con muy pocas opciones terapéuticas eficaces actualmente.

Al final del proyecto, se espera obtener una **formulación capaz de inactivar significativamente la proteína KRAS** y reducir el desarrollo tumoral en modelos animales, lo que podría representar un primer paso hacia nuevos tratamientos más específicos y eficaces contra el PDAC con KRAS mutado.

A partir de esta idea general, se plantean las siguientes **hipótesis**:

1. El uso de biomoléculas (anticuerpos, nanocuerpos o afímeros) dirigidos contra KRAS permitirá concentrar la acción terapéutica únicamente en las células tumorales con esta mutación, **reduciendo así los efectos secundarios en tejidos sanos**.

2. Estas biomoléculas podrían **superar los mecanismos clásicos de resistencia a los medicamentos** que suelen afectar a las terapias basadas en inhibidores químicos.
3. La **incorporación de las biomoléculas en sistemas de liberación biocompatibles**, como micelas poliméricas (PM) o vesículas extracelulares (EV), mejorará su circulación en el organismo, facilitará su entrada en las células tumorales y **aumentará la eficacia del tratamiento**.

Para validar estas hipótesis y alcanzar el objetivo principal del proyecto, se han definido los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Seleccionar distintas líneas celulares de PDAC** con mutaciones en KRAS. A partir de estas líneas, se generarán modelos celulares modificados genéticamente para poder estudiar con precisión los efectos del tratamiento.
2. **Producir y purificar diferentes biomoléculas** (anticuerpos, nanocuerpos o afímeros) específicos contra la proteína KRAS mutada (en concreto, la variante G12D), y validar su capacidad de bloquear la actividad de KRAS en ensayos *in vitro*.
3. **Diseñar y caracterizar las nanoformulaciones** para encapsulación de las biomoléculas seleccionadas.
4. Evaluar la **seguridad y eficacia *in vitro*** de estas formulaciones en las líneas celulares seleccionadas.
5. **Realizar estudios *in vivo*** en modelos animales con tumores derivados de pacientes (PDX), comparando la nueva terapia con los tratamientos convencionales

5. Alteraciones al proyecto

Además de la selección, cribado y validación de posibles nanocuerpos y afímeros con actividad específica contra el KRAS mutado, paralelamente se siguió con línea de investigación del grupo relativa a la entrega intracelular de anticuerpos contra KRAS. En este sentido se testó la combinación del anticuerpo KRAS que ya había demostrado resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo* con un fármaco citotóxico (Docetaxel) y estudiar el posible efecto sinérgico entre ambos agentes terapéuticos.

Además, se testó si la incorporación de un péptido de penetración celular creado y patentado por el grupo incrementa la eficacia terapéutica de las estrategias terapéuticas desarrolladas.

6. Resultados relevantes

6.1. Encapsulación de Afímeros contra el KRAS en Micelas Poliméricas y su Validación in vitro

Con el objetivo de desarrollar sistemas eficaces de liberación de fármacos basados en nanotecnología para el direccionamiento específico del KRAS intracelular, durante este proyecto hemos sintetizado, caracterizado y probado *in vitro* diferentes formulaciones de micelas poliméricas (PM), cargadas con afímeros anti-KRAS seleccionados hasta el momento (K3, K6) y un afímero control (alanina).

Las micelas vacías (PM), como se demostró mediante medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 2), presentaron una forma esférica, un diámetro medio de aproximadamente 26 nm, un índice de polidispersidad < 0.25 y una carga ligeramente negativa (Tabla 1). La presencia de los afímeros (K3, K6 y alanina) en las nanopartículas no afectó sus propiedades fisicoquímicas. La eficiencia de encapsulación de los afímeros fue > 60 % en todos los casos.

Tabla 1. Tabla resumen de las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones analizadas: diámetro medio (distribución del tamaño por intensidad), índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta y eficiencia de encapsulación (EE). Los resultados se expresan como media ± DE, $n \geq 3$. N.A. – Datos no disponibles.

Formulación	Diámetro (nm)		PDI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
PM	25.82	2.76	0.24	0.03	-2.02 0.56 N.A.
PM-K3	27.42	0.99	0.33	0.08	-2.62 4.48 71.11 3.77
PM-K6	25.99	0.87	0.26	0.02	0.72 1.60 68.08 2.41
PM-Ala	25.55	1.22	0.26	0.03	-2.34 3.77 62.05 0.99

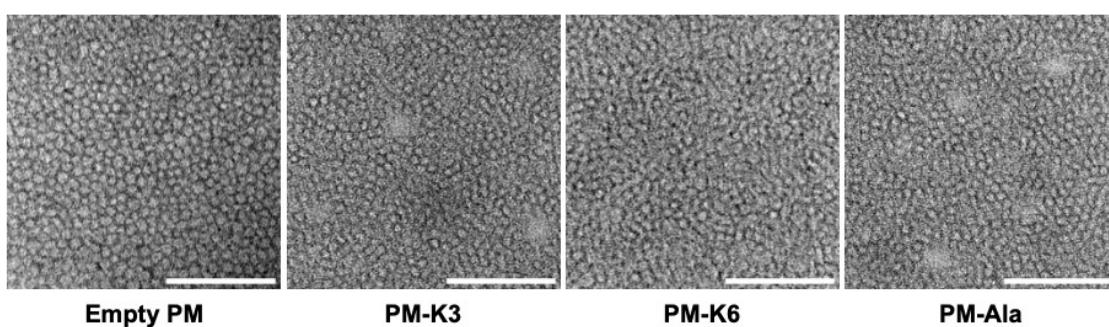


Figura 2. Microfotografías por TEM de diferentes formulaciones. La barra de escala representa 200 μm y el objetivo utilizado fue 150X.

La eficacia terapéutica de los afímeros libres o encapsulados en micelas poliméricas fue testada in vitro en dos líneas celulares de cáncer de páncreas, MIA PaCa-2 que posee una mutación en el KRAS y PANC-1 que no depende funcionalmente de KRAS.

Los resultados obtenidos (Figura 3) sugieren que la eficacia observada con el afímero K3, tanto libre como encapsulado, no está claramente asociada a una inhibición específica de la vía KRAS. Aunque el afímero K3 mostró mayor efecto citotóxico que el afímero de alanina en células MIA PaCa-2, este efecto también se observó en la línea celular PANC-1, lo cual indica una posible acción inespecífica. Un comportamiento similar se verificó con el afímero K6. En conjunto, estos resultados evidencian que la afinidad de los afímeros testados hacia KRAS aún no es suficiente para garantizar una acción terapéutica específica y eficaz, por lo que se hace necesario seleccionar y evaluar nuevos afímeros con mayor especificidad.

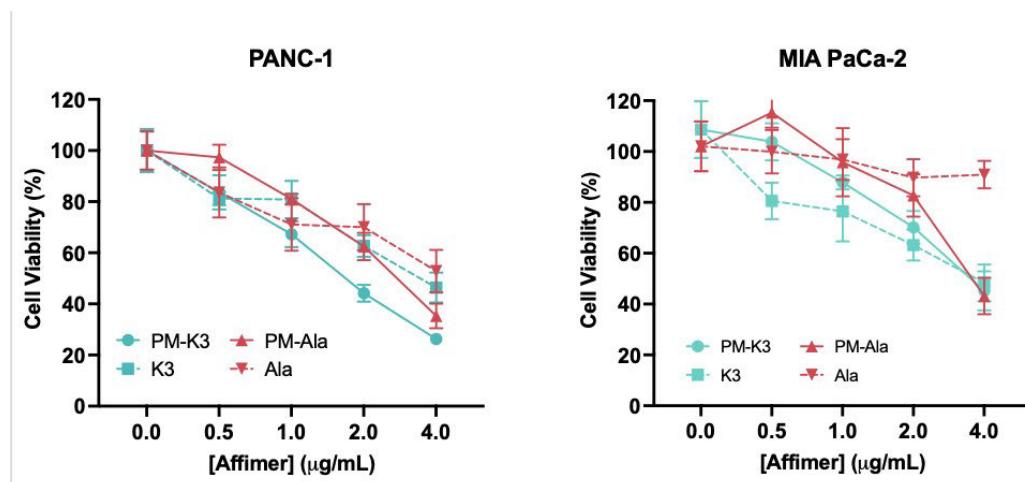


Figura 3. Evaluación de la eficacia in vitro de afímeros libres y micelas cargadas con afímeros en condiciones adherentes utilizando líneas celulares pancreáticas. Los resultados se expresan como media \pm DE, $n \geq 3$.

6.2. Cribado y Secuenciación de una Biblioteca Sintética de Nanocuerpos anti-KRAS

Con el fin de seguir buscando nuevas alternativas al uso de los afímeros, llevamos a cabo enfoques experimentales de cribado de una biblioteca de nanocuerpos en fagos que se unen a la variante G12D del KRAS. Los clones con actividad de unión a KRAS fueron aislados mediante biopanning por phage display y sometidos a amplificación por PCR. Como se puede observar en los resultados de la electroforesis (Figura 4), la mayoría de los clones seleccionados fueron amplificados con éxito.

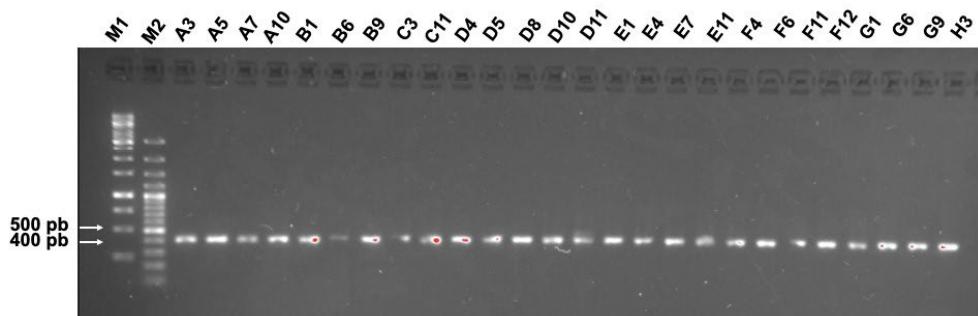


Figura 4. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa. El gel de electroforesis muestra productos de PCR con los tamaños esperados para los clones seleccionados. Utilizando marcadores de peso molecular (M1 y M2) como referencia, se observaron bandas de ADN correspondientes a los 26 clones seleccionados (400 pb). M1 – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; M2 – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; cada letra, de la A a la H, corresponde a un clon.

A continuación, los productos de PCR purificados fueron secuenciados y, finalmente, mediante el procesamiento y comparación de las secuencias proteicas, se seleccionaron 6 de los 26 clones candidatos, designados como A3, A10, B9, C11, E11 y F6 (Figura 5). La selección de los clones se basó en la presencia de diferencias en la secuencia de aminoácidos. Como era de esperar, la secuencia control, correspondiente a la de un nanocuerpo que reconoce Bet v1, el principal alérgeno del polen de abedul mostró el mayor número de diferencias en comparación con las demás. En cuanto a los clones seleccionados, las secuencias proteicas de los clones A10, C11, E11 y F6 fueron muy similares entre sí, diferenciándose solo en 1 o 2 aminoácidos, mientras que las secuencias de los clones B9 y A3 mostraron numerosas diferencias tanto entre ellas como con respecto al resto.

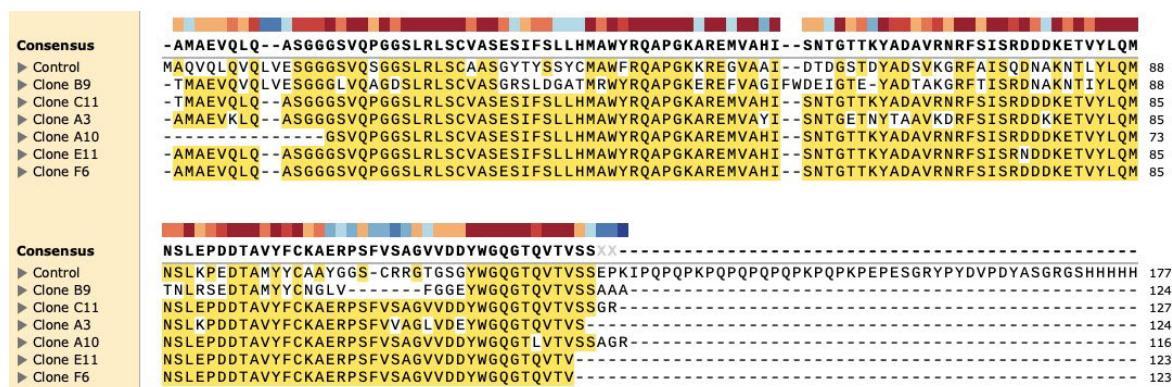


Figura 5. Alineamiento de la secuencia proteica de los 6 clones seleccionados junto con una secuencia control. Los aminoácidos que coinciden con la secuencia de referencia están resaltados en amarillo. La barra de color representa la conservación de la secuencia (escala de 0 a 100, siendo 100 el nivel máximo de conservación). Colores rojizos indican altos niveles de conservación; colores azulados indican bajos niveles de conservación. La secuencia control fue obtenida de la base de datos GenBank bajo el número de acceso MZ708607.1. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MZ708607.1>).

Una vez confirmado que los clones presentaban secuencias de aminoácidos diferentes, se determinó la estructura cristalina de los nanocuerpos en complejo con KRAS no mutado (wild-type), revelando que todos los clones interactúan con la proteína diana (Figura 6).

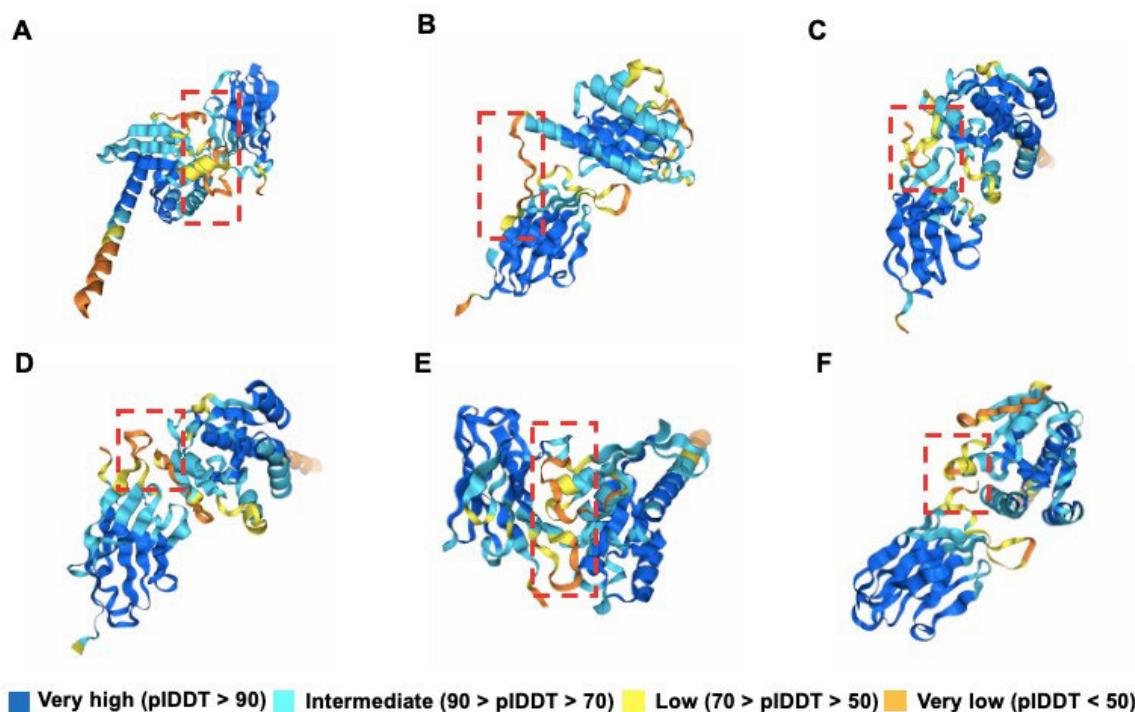


Figura 6. Interacciones entre cada clon y KRAS silvestre. (A) KRAS (izquierda) co-cristalizado con el clon A3 (derecha). (B) Clon A10 (izquierda) co-cristalizado con KRAS (derecha). (C) Clon B9 (izquierda) co-cristalizado con KRAS (derecha). (D) Clon C11 (izquierda) co-cristalizado con KRAS (derecha). (E) Clon E11 (izquierda) co-cristalizado con KRAS (derecha). (F) Clon F6 (izquierda) co-cristalizado con KRAS (derecha). El valor pIDDT es un parámetro generado por el servidor AlphaFold que corresponde a una estimación de confianza por átomo, en una escala de 0 a 100, donde un valor más alto indica mayor confianza.

Los recuadros rojos destacan las áreas de interacción aumentada entre cada clon de nanocuerpo y KRAS.

Se puede observar que los clones A10, C11 y F6 interactúan con regiones superficiales de KRAS, mientras que los clones restantes (A3, B9 y C11) se unen a bolsillos más profundos, lo que sugiere que su actividad anti-KRAS podría ser más eficaz.

El testado *in vitro* para la validación de los nanocuerpos seleccionados se encuentra en marcha, y se están buscando más nanocuerpos con posible afinidad para el KRAS mutado.

6.3. Combinación Sinérgica entre el Anticuerpo anti-KRAS y un Fármaco Citotóxico Convencional usando Nanopartículas

Debido a los resultados prometedores obtenidos anteriormente que demuestran la eficacia comprobada de micelas cargadas con anticuerpos anti-KRAS (PM-KRAS), hemos decidido evaluar la actividad antitumoral de una terapia combinada utilizando esta formulación junto con un fármaco citotóxico convencional, como el docetaxel, en la línea celular de PDAC con mutación KRAS MIA PaCa-2.

No se detectó un efecto citotóxico significativo en las células tratadas con micelas vacías (PM), lo que confirma el perfil biocompatible y seguro ampliamente conocido de las formulaciones basadas en Pluronic® F-127 (Figura 7). Como era de esperar, el anticuerpo anti-KRAS encapsulado redujo la viabilidad celular, observándose un mayor efecto con el aumento de la concentración.

Por otro lado, todas las formulaciones de docetaxel, incluidas las que contenían anticuerpo anti-KRAS y docetaxel libre, causaron una fuerte reducción de la viabilidad celular, lo que respalda la viabilidad de una terapia combinada con un fármaco citotóxico convencional.

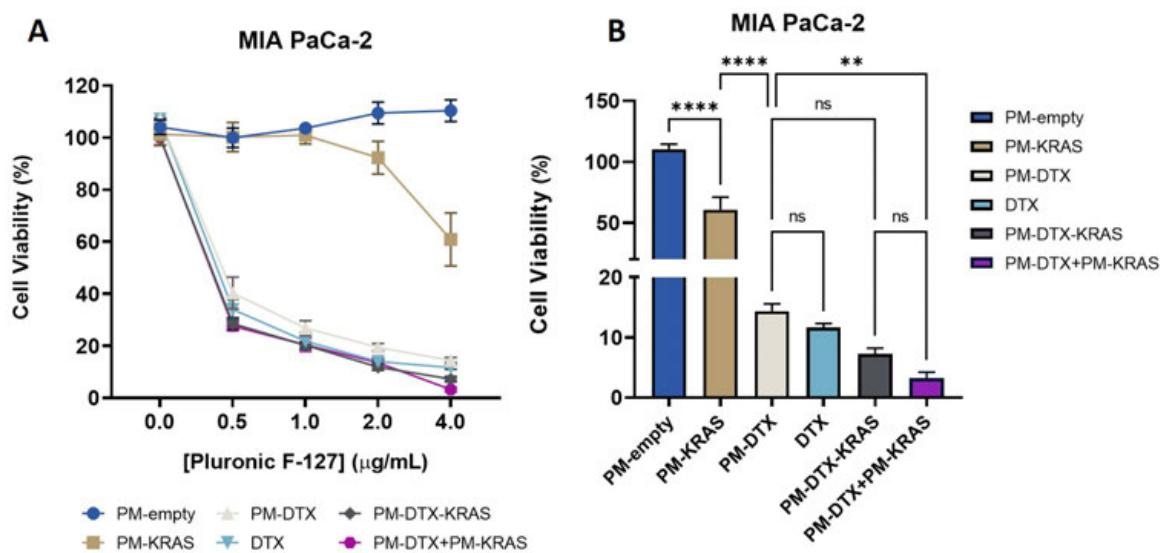
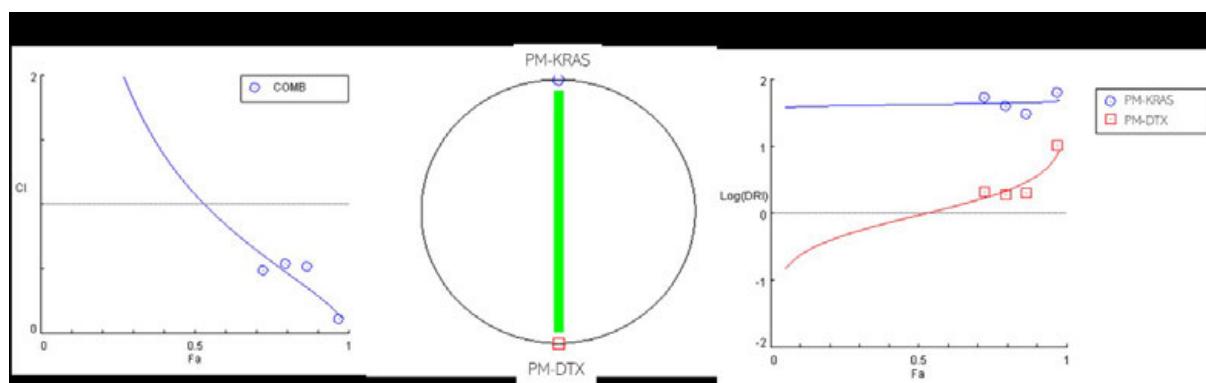


Figura 7. Evaluación de la citotoxicidad in vitro de diferentes formulaciones en condiciones de cultivo adherente usando células MIA PaCa-2. (A) Curvas de viabilidad celular de células MIA PaCa-2 tratadas con concentraciones crecientes de varias formulaciones. (B) Porcentaje de viabilidad celular a la dosis máxima (4 μg/mL para anticuerpo anti-KRAS y 0.5 μg/mL para docetaxel (DTX)). Los resultados se expresan como media ± DE, n ≥ 3, ns-no significativo, * p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001.

Para evaluar si la combinación de PM-DTX y PM-KRAS tiene una naturaleza sinérgica o aditiva, se determinó el índice de combinación (CI) para cada concentración ensayada mediante el método matemático de Chou-Talalay.

Se observó que el CI fue inferior a 1, el poligonograma mostró una línea sólida y gruesa, y el log(DRI) fue superior a 0 en todas las condiciones analizadas, lo que indica que la interacción entre ambas nanopartículas promueve un efecto sinérgico y no aditivo (Figura 8). El impacto de un efecto sinérgico es ampliamente positivo en una posible traslación clínica, ya que permite una mayor eficacia terapéutica con menores dosis de los compuestos, lo que puede resultar en menores efectos adversos y menores costes asociados al tratamiento.



(Figura 8). Evaluación del efecto sinérgico de PM-DTX y PM-KRAS mediante el método del índice de combinación de Chou-Talalay. (A) Gráfico del índice de combinación (CI) que muestra todos los valores de CI menores de 1, indicando sinergismo entre PM-KRAS y PM-DTX (COMB). (B) Poligonograma con una línea verde gruesa que indica el efecto sinérgico entre PM-KRAS y PM-DTX. (Línea continua indica sinergismo, línea discontinua indica antagonismo, línea gruesa indica interacción fuerte y línea delgada indica interacción débil). (C) Determinación del DRI (Índice de Reducción de Dosis); un log(DRI) superior a 0 indica una reducción favorable de la dosis de los fármacos en combinación en comparación con los fármacos por separado. Gráficos obtenidos con CompuSyn (versión 1.0, CompuSyn Corporation).

6.4. Conjugación del anticuerpo KRAS con un péptido de penetración celular

Además de la utilización de nanopartículas, otra posible estrategia para la liberación intracelular de biomoléculas es la utilización de péptidos de penetración celular. Esta estrategia, en caso de demostrar ser efectiva, permite una mejor traslación a la clínica al permitir una producción a nivel industrial menos compleja. En este sentido, se conjugó el anticuerpo anti-KRAS con un péptido de penetración celular (F7) derivado de la proteína transmembrana CD300f, creado y patentado por el grupo de investigación (EP21802380.2).

Como se puede observar en la Figura 9, la conjugación del anticuerpo con el péptido F7 promueve una mayor muerte de las células MIA PaCa-2, lo que puede indicar una mayor internalización del anticuerpo y mayor efecto terapéutico. Se están a desarrollar más estudios con más líneas celulares para poder validar esta estrategia y entender el mecanismo de acción de esta combinación.

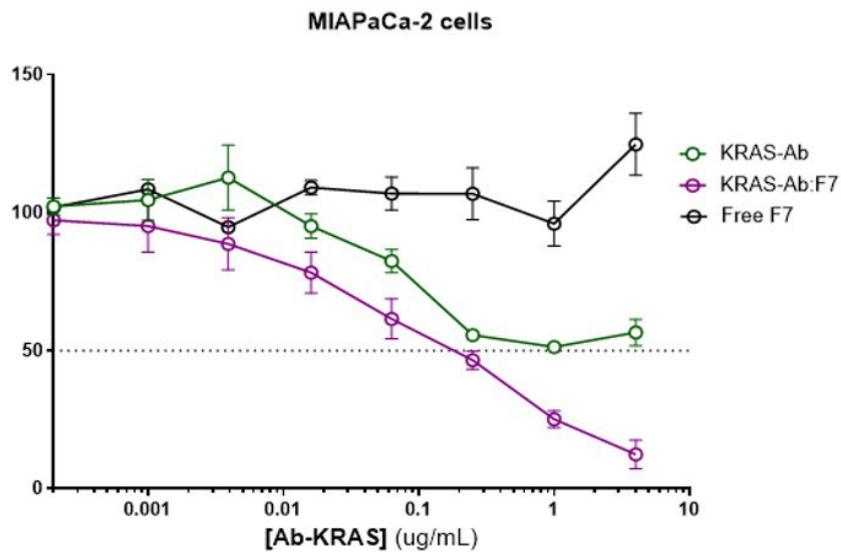


Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad in vitro del anticuerpo anti-KRAS (KRAS-Ab), el péptido F7 y la conjugación de ambos (KRAS-Ab:F7) en condiciones de cultivo adherente usando células MIA PaCa-2. Curvas de viabilidad celular de células MIA PaCa-2 tratadas con concentraciones crecientes de varias formulaciones. Los resultados se expresan como media \pm DE, $n \geq 3$.

Conclusiones

Este proyecto se centra en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) con mutaciones en KRAS, combinando herramientas de biotecnología avanzada y nanomedicina.

- 1. Encapsulación y validación de afímeros:** Se han desarrollado y caracterizado distintas formulaciones de micelas poliméricas (PM) cargadas con afímeros anti-KRAS. Aunque las formulaciones presentaron buenas propiedades fisicoquímicas y una alta eficiencia de encapsulación, los estudios in vitro demostraron que la eficacia observada de los afímeros no se asoció claramente a una inhibición específica de KRAS, especialmente al observar efectos citotóxicos en líneas celulares no dependientes de esta vía. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de seleccionar y validar nuevos afímeros con mayor afinidad y especificidad hacia KRAS mutado.
- 2. Cribado de nanocuerpos anti-KRAS:** Se seleccionaron y caracterizaron nuevos nanocuerpos mediante técnicas de phage display y análisis estructural. Se identificaron seis candidatos con diferentes perfiles de interacción con KRAS, lo que representa un paso importante hacia el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces y específicos. Actualmente, estos clones están siendo validados en estudios funcionales in vitro.

3. **Terapia combinada con anticuerpo anti-KRAS y docetaxel:** Se demostró que la combinación de un anticuerpo anti-KRAS encapsulado en micelas poliméricas con el fármaco citotóxico docetaxel produce un efecto sinérgico en células MIA PaCa-2. Esta sinergia podría permitir el uso de dosis más bajas, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo potencialmente los efectos secundarios.
4. **Uso de péptidos de penetración celular:** La conjugación del anticuerpo anti-KRAS con el péptido F7, diseñado y patentado por el grupo, mostró resultados prometedores, mejorando la eficacia terapéutica posiblemente gracias a una mayor internalización celular.

En conjunto, estos hallazgos sientan las bases para el diseño de terapias más seguras, específicas y eficaces contra el PDAC con mutaciones en KRAS. A pesar de que los afímeros iniciales no mostraron una eficacia específica suficiente, el proyecto ha abierto nuevas vías mediante el cribado de nanocuerpos y el uso combinado de herramientas terapéuticas innovadoras, acercando un paso más la posibilidad de tratar este tipo de cáncer con estrategias dirigidas y de alta precisión.



Beca 2023 (Clínica)

Pilar Navarro :

Pilar Navarro es licenciada y doctora en Farmacia. Su carrera investigadora se ha centrado en entender los mecanismos que causan enfermedades humanas, especialmente el cáncer. Comenzó estudiando el cáncer de piel durante su tesis doctoral y, tras una etapa postdoctoral en Milán centrada en la formación de vasos sanguíneos en tumores, se incorporó en 1999 a Barcelona para investigar el cáncer de páncreas.

Actualmente dirige el grupo "Dianas Moleculares del Cáncer" en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC) y el Instituto de Investigación del Hospital del Mar, con el objetivo de encontrar nuevas herramientas para diagnosticar y tratar mejor este tipo de cáncer.

TITULO:

Validación de la detección de sAXL en plasma para diagnóstico precoz del cáncer de páncreas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Pilar Navarro

EQUIPO INVESTIGADOR: Pablo García de Frutos, Laura Visa, Luis Barranco, Neus Martínez-Bosch, Teresa Macarulla, Florián Castet, Carles Fabregat, Mª Pilar Marco, Juan Pablo Salvador.

Introducción: El reto del cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas, conocido médicaamente como adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), es uno de los tipos de cáncer más agresivos y mortales. A pesar de los avances científicos en oncología, su diagnóstico suele realizarse de forma tardía, cuando la enfermedad ya se encuentra en fases avanzadas y se ha diseminado a otros órganos.

Esto sucede por varias razones:

- **No presenta síntomas específicos en las primeras fases:** suele manifestarse con molestias digestivas vagas, pérdida de apetito o dolor abdominal inespecífico.
- **No existen pruebas de detección precoz rutinarias:** a diferencia de otros tipos de cáncer como el de mama o colon, no disponemos de programas de cribado sistemático.
- **El único marcador aprobado, CA19-9, es insuficiente:** puede estar elevado en enfermedades benignas como la pancreatitis y no siempre se eleva en todos los pacientes con cáncer.



Figura 1. Actualmente el 80% de los pacientes con un cáncer de páncreas se diagnostican en etapas avanzadas cuando ya presentan metástasis y la supervivencia media a 5 años es solamente de un 3%. Un test de diagnóstico precoz permitiría diagnosticar a los pacientes en etapas más tempranas, cuando podrían ser candidatos a cirugía y su supervivencia media aumentaría de forma muy significativa.

Esta situación provoca que más del 80% de los pacientes sean diagnosticados en fases avanzadas y metastásicas, cuando la única opción curativa (la cirugía) ya no es viable. Esto tiene un impacto devastador tanto en la supervivencia, como en el coste social y económico para el sistema sanitario.

En este contexto, la investigación en nuevos métodos de diagnóstico precoz es urgente y constituye una de las mayores prioridades de la comunidad científica y de las asociaciones de pacientes.

Una nueva esperanza: el biomarcador sAXL

Nuestro grupo de investigación ha trabajado intensamente en buscar alternativas de diagnóstico más eficaces y accesibles para el cáncer de páncreas. Fruto de este trabajo hemos identificado un biomarcador en sangre, el **AXL soluble (sAXL)**, que podría revolucionar la forma en que se detecta este tipo de tumor.

¿Qué es sAXL?

AXL es una proteína de la familia de las tirosina-quinasas, implicada en la regulación del crecimiento y la supervivencia celular. Cuando se encuentra en forma soluble (sAXL) en la sangre, puede ser un indicador de la presencia de células tumorales. En estudios previos publicados en 2022 por nuestro equipo en 200 pacientes, hemos demostrado que los niveles de sAXL están significativamente elevados en pacientes con cáncer de páncreas, incluso en fases iniciales, mientras que permanecen bajos en personas sanas o con pancreatitis crónica.

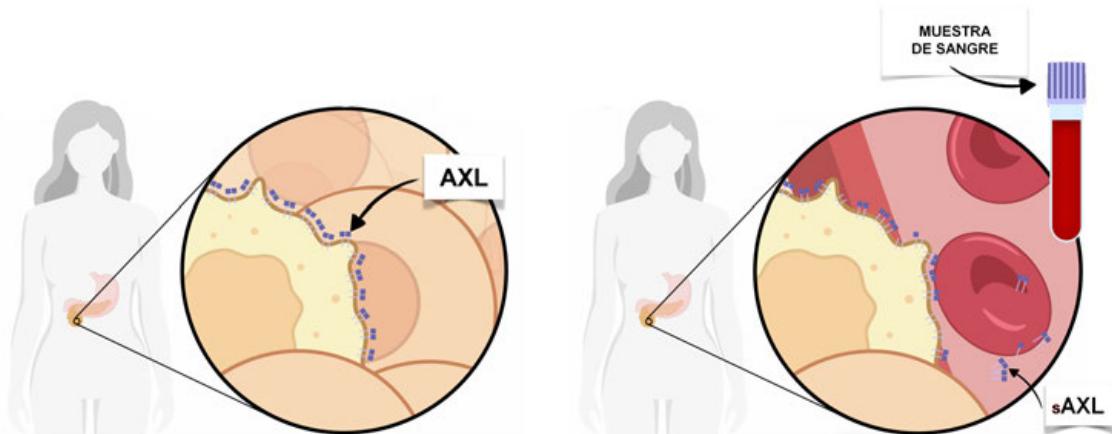


Figura 2. AXL es una proteína que se encuentra en la membrana de las células pancreáticas tumorales. AXL puede liberarse de la membrana dando lugar a una fracción soluble (sAXL) que puede pasar a la sangre y ser detectada con un sencillo análisis de sangre.

Además, cuando se combina con el marcador CA19-9, la precisión diagnóstica aumenta de forma notable, más del 90% de los casos se detectan de forma correcta, y se evitan falsos positivos. Esto significa que la prueba podría identificar de forma temprana la presencia del tumor y, además, distinguirlo de otras enfermedades benignas.

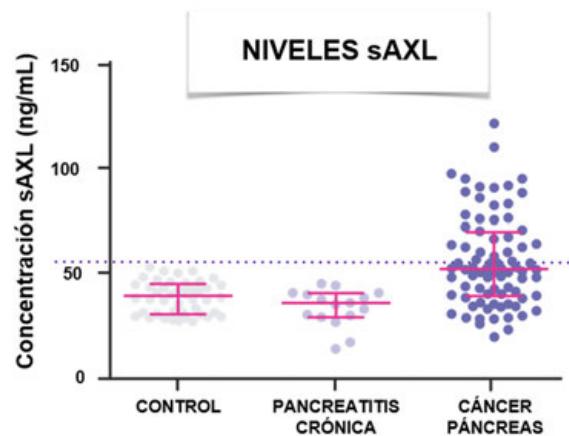


Figura 3. Los niveles de AXL soluble (sAXL) en sangre se encuentran elevados en la mayoría de los pacientes con un cáncer de páncreas, en comparación con controles y pacientes con una pancreatitis crónica.

Objetivos del proyecto: un reto con dos grandes metas

Para validar y llevar a la práctica clínica este descubrimiento, hemos puesto en marcha un proyecto con dos objetivos complementarios:

Objetivo 1: Validar sAXL como biomarcador en un estudio multicéntrico

Se analizarán muestras de sangre de más de 500 personas, distribuidas en tres grupos:

- Personas sanas (≥ 100)
- Pacientes con pancreatitis crónica (≥ 100)
- Pacientes con cáncer de páncreas (≥ 300)

El análisis se realizará mediante una técnica sencilla y económica llamada ELISA (un análisis de laboratorio que permite cuantificar proteínas en sangre). Este paso es esencial para establecer con precisión el valor de corte ("cut-off") que determinará si un resultado es positivo o negativo.

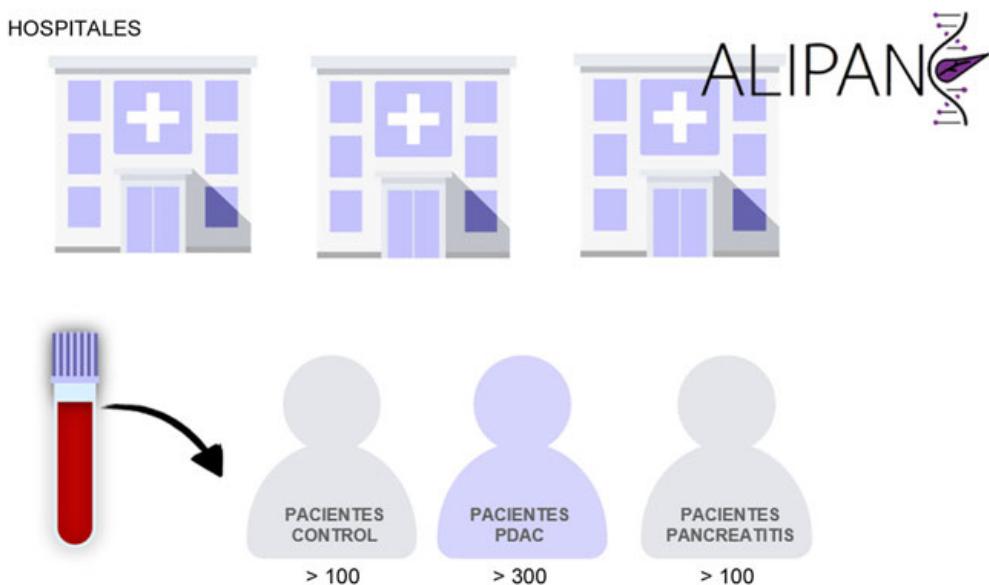


Figura 4. Mediante nuestra colaboración con ALIPANC contactaremos con diferentes hospitales españoles para poder centralizar una recogida de muestras de más de 100 controles, más de 100 pacientes con pancreatitis crónica y más de 300 pacientes con cáncer de páncreas.

Además, se comparará el rendimiento diagnóstico de sAXL con el marcador CA19-9 y se evaluará si la combinación de ambos ofrece mejores resultados. Esto permitirá consolidar la utilidad de la prueba para su posible uso en la práctica clínica como herramienta de detección precoz.

Objetivo 2: Desarrollar un test rápido (LFIA)

De forma paralela, queremos desarrollar un dispositivo de tipo "tira reactiva" (LFIA), similar a un test de embarazo o de COVID-19. Este dispositivo permitiría detectar sAXL en sangre de forma rápida, sencilla y económica, sin necesidad de un laboratorio especializado. Este enfoque tiene un gran potencial para ser utilizado en hospitales, centros de salud y, especialmente, en cribados de poblaciones de riesgo (familiares de pacientes, personas con pancreatitis crónica, obesidad o diabetes).

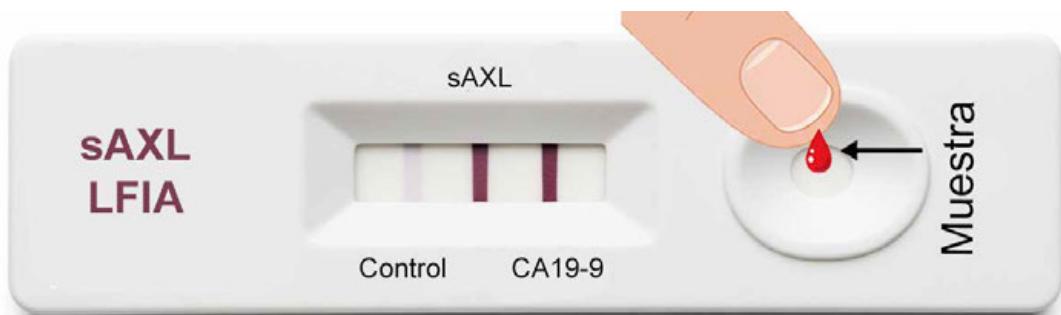


Figura 5. Dispositivo LFIA (lateral Flow immunoassay) para la detección de AXL soluble en sangre.

¿Cómo se llevará a cabo el estudio?

¿De dónde salen las muestras?

Contamos con una red de hospitales y centros de investigación tanto nacionales como internacionales que colaborarán en la recolección de las muestras necesarias. Nuestro grupo forma parte de ALIPANC, una plataforma que reúne a expertos en cáncer de páncreas de toda España, lo que nos permitirá acceder a muestras tanto retrospectivas (ya almacenadas) como prospectivas (recolectadas durante el estudio) de diferentes hospitales españoles.

Análisis de laboratorio

Cada muestra de sangre se analizará mediante la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), que es un método fiable y asequible. Cada análisis se hará por duplicado y en varias placas independientes para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

En paralelo, se medirá también el marcador CA19-9 en todas las muestras, para comparar los resultados y estudiar la combinación de ambos biomarcadores.

Desarrollo del test rápido (LFIA)

El desarrollo de este dispositivo de flujo lateral (LFIA) permitirá disponer de una prueba portátil, económica y fácil de usar. Esto se consigue mediante la combinación de anticuerpos específicos y partículas de oro que reaccionan en la presencia de sAXL, generando una señal visible en un dispositivo parecido a los tests COVID-19 o de embarazo.

Se trabajará en la selección de los mejores anticuerpos de captura y detección, optimizando las condiciones de ensayo para lograr la máxima sensibilidad y especificidad. El rendimiento del test se validará primero en proteínas purificadas y, posteriormente, en plasma humano real.

Cuando esté listo, se comparará directamente con el análisis de ELISA para comprobar su fiabilidad. Esto garantizará que el test rápido pueda ser utilizado de forma segura y eficaz.

El impacto potencial del proyecto

El impacto que este proyecto podría tener:

- **Para los pacientes:** significaría tener una oportunidad real de detectar el cáncer de páncreas en fases iniciales, cuando todavía es posible la cirugía y la curación. Esto podría salvar vidas y mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias.
- **Para los médicos:** se dispondría de una herramienta fiable, sencilla y económica que permitiría realizar pruebas de forma más frecuente, especialmente en grupos de riesgo.
- **Para el sistema sanitario:** al detectar el cáncer de forma temprana, se reducirían los costes asociados a tratamientos en fases avanzadas (el coste medio anual por paciente puede superar los 50.000 €). Además, un diagnóstico precoz permitiría tratamientos más eficaces y menos agresivos.
- **Para la sociedad:** el cáncer de páncreas tiene un gran impacto emocional en las familias. Este proyecto podría aportar esperanza y mejorar el pronóstico de una enfermedad que, hasta ahora, tenía muy pocas opciones de detección precoz.

Conclusión: una nueva puerta a la esperanza

El cáncer de páncreas sigue siendo uno de los mayores retos en oncología, pero este proyecto representa un posible avance hacia su detección precoz. Validar el biomarcador sAXL y desarrollar un test rápido permitiría transformar la forma en que se diagnostica la enfermedad, abriendo la puerta a tratamientos más efectivos y aumentando la supervivencia.

Este proyecto no solo se basa en la ciencia, sino en el compromiso con los pacientes y sus familias. Porque cada avance que logramos es una victoria compartida.

Glosario de términos

- **PDAC:** Adenocarcinoma ductal pancreático (el tipo más común de cáncer de páncreas).
- **sAXL:** Forma soluble de la proteína AXL, presente en la sangre.
- **ELISA:** Técnica de laboratorio para medir proteínas en sangre.
- **LFIA:** Ensayo inmunológico de flujo lateral (test rápido tipo tira reactiva).
- **CA19-9:** Marcador tumoral en sangre aprobado para cáncer de páncreas.



Beca 2024 (Básica)

Carmen Guerra:

Doctorado en Microbiología e Inmunología en la La Dra Guerra es farmacéutica y bióloga molecular con más de 30 años de experiencia en investigación en biología molecular, y más de 20 años dedicados específicamente al estudio del cáncer de páncreas. Obtuvo su doctorado en 1994 en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), donde estudió los mecanismos moleculares que regulan el tejido adiposo marrón bajo la supervisión de las doctoras Margarita Fernández y Manuel Benito.

Tras finalizar su doctorado, realizó una estancia postdoctoral en The Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.) en el laboratorio del Dr. Leslie P. Kozak. Allí, desarrolló modelos de ratón modificados genéticamente para investigar la base genética de la obesidad.

Desde 1998, la Dra. Guerra ha sido una integrante clave del laboratorio del Dr. Mariano Barbacid en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), donde su investigación se ha centrado principalmente en la tumorigénesis impulsada por Ras, con un enfoque especial en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de modelos de ratón genéticamente modificados que reproducen el cáncer de páncreas humano. Estos modelos han sido esenciales para elucidar los mecanismos moleculares de iniciación y progresión tumoral, así como para desarrollar y validar nuevas estrategias terapéuticas en entornos preclínicos.

TITULO:

Mecanismos moleculares y estrategias para la prevención y diagnóstico temprano del cáncer de páncreas.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Carmen Guerra

Introducción y antecedentes

¿Qué es el cáncer de páncreas y por qué es tan peligroso?

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) es un tipo de cáncer que se origina en las células que forman los conductos del páncreas, un órgano ubicado detrás del estómago que cumple funciones muy importantes en la digestión y en la regulación del azúcar en sangre. Este cáncer es uno de los más agresivos y letales, siendo la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial.

Una de las principales dificultades para combatir el cáncer de páncreas es que generalmente se diagnostica en etapas muy avanzadas. En estas etapas, el tumor suele haberse extendido a otros órganos y la única opción curativa disponible, la cirugía, ya no es posible. Por ello, la tasa de supervivencia a 5 años es inferior al 10%.

Además, el tratamiento que existe actualmente para el cáncer de páncreas no ha cambiado mucho en las últimas décadas. Los medicamentos disponibles, como la gemcitabina, mejoran la supervivencia sólo unas pocas semanas y no logran detener el avance de la enfermedad.

Aumento de casos y preocupación por población joven

En las últimas décadas, se ha detectado un aumento preocupante en el número de casos de cáncer de páncreas, especialmente en personas jóvenes, menores de 45 años. Aunque este tipo de cáncer es más común en personas mayores de 65 años, la aparición temprana de la enfermedad en jóvenes ha hecho sonar una alarma en la comunidad médica.

Este incremento no se explica por mayores programas de detección, sino que parece estar asociado a cambios en el estilo de vida y la exposición a ciertos factores de riesgo desde edades tempranas.

Factores de riesgo y su papel en el desarrollo del cáncer

Los factores de riesgo más conocidos para el cáncer de páncreas son:

forman los conductos del páncreas, un órgano ubicado detrás del estómago que cumple funciones

- **Pancreatitis crónica:** inflamación prolongada del páncreas que puede causar daño y cambios en las células.
- **Tabaquismo:** el humo del cigarrillo contiene sustancias que dañan el ADN y promueven mutaciones.
- **Consumo de alcohol:** especialmente en grandes cantidades, puede provocar inflamación y daños en el páncreas.
- **Obesidad y dieta alta en grasas:** relacionadas con inflamación crónica y resistencia a la insulina, favoreciendo cambios celulares.

Aunque se sabe que estos factores aumentan el riesgo, aún no se comprende del todo cómo afectan las células pancreáticas a nivel molecular para iniciar el cáncer.

La mutación KRAS y la transformación de las células acinares

La mayoría de los cánceres de páncreas presentan mutaciones en un gen llamado **KRAS**, que actúa como un "interruptor" que controla el crecimiento y división celular. Cuando KRAS está mutado, este interruptor se queda encendido, haciendo que las células crezcan sin control.

En el páncreas, la transformación comienza en las células **acinares**, que normalmente producen enzimas digestivas. Estas células, al adquirir la mutación KRAS, sufren un cambio llamado metaplasia acino-ductal (ADM), en el que se transforman en células parecidas a las de los conductos pancreáticos. Estas células cambian progresivamente, formando lesiones preneoplásicas (llamadas PanIN) que pueden avanzar a cáncer.

El modelo animal para estudiar el cáncer de páncreas

Para entender mejor cómo se inicia el cáncer y cómo los factores de riesgo influyen en este proceso, nuestro equipo ha desarrollado un modelo experimental con ratones genéticamente modificados. Estos ratones expresan la mutación KRAS específicamente en las células acinares del páncreas, lo que les permite simular la progresión de la enfermedad humana.

Un hallazgo clave de nuestro trabajo es que las células acinares adultas no se transforman fácilmente por la mutación KRAS a menos que estén sometidas a inflamación o estrés, como el provocado por la pancreatitis. Esto sugiere que la mutación por sí sola no es suficiente y que los factores de riesgo juegan un papel esencial para activar el desarrollo tumoral.

¿Cuál es el mecanismo de transformación de un acino adulto que expresa el oncogén Kras?

Fig 1

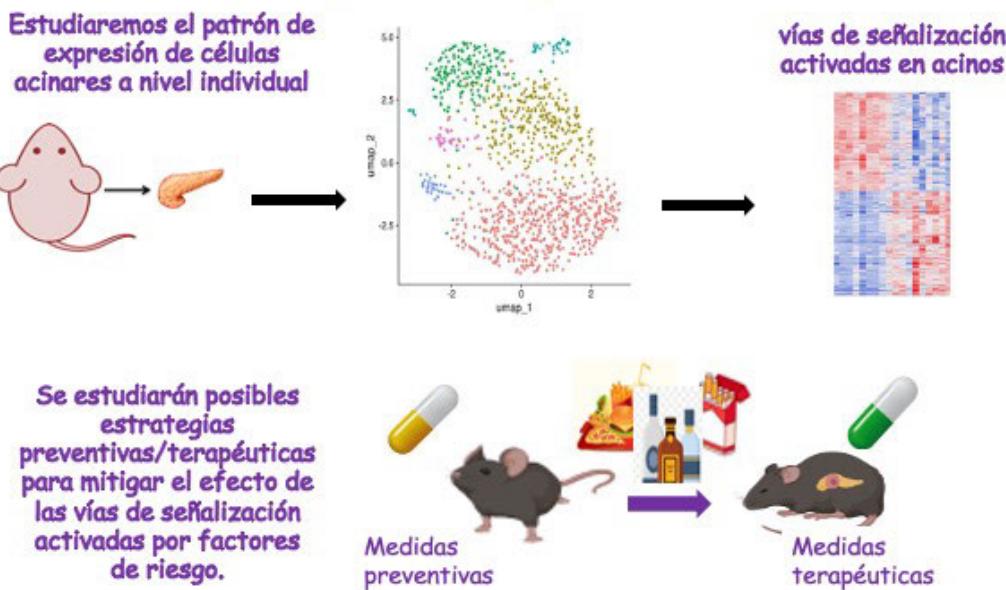


Figura 1: Esquema resumen del proyecto

Hipótesis y objetivos

Proponemos que los factores de riesgo como la pancreatitis, tabaquismo, alcohol y obesidad actúan como detonantes que promueven la transformación de las células acinares que ya portan la mutación KRAS, y que cada uno de estos factores activa vías moleculares específicas que pueden ser bloqueadas para prevenir o tratar el cáncer (Figura 1).

Objetivos específicos

- Evaluar el impacto de diferentes factores de riesgo en la iniciación tumoral en células acinares adultas con mutación KRAS:** compararemos la transformación celular y desarrollo de lesiones en ratones expuestos a pancreatitis, nicotina, alcohol y dieta alta en grasas.
- Identificar los mecanismos moleculares implicados en esta transformación:** a través de análisis a nivel de célula única (single-cell RNA sequencing), caracterizaremos qué genes y vías se activan con cada factor.

3. **Diseñar estrategias preventivas y terapéuticas basadas en las vías identificadas:** validaremos en ratones el uso de inhibidores farmacológicos que bloqueen los procesos que conducen a la transformación tumoral.
4. **Descubrir y validar biomarcadores para diagnóstico precoz:** estudiaremos biomarcadores detectables en sangre o fluidos, para facilitar la detección temprana en humanos, en colaboración con hospitales.

Metodología

Modelo animal

Utilizaremos un modelo de ratón con la mutación KRAS activable en células acinares bajo control temporal, permitiendo inducir la expresión desde etapas embrionarias o en la edad adulta. Esto es clave para entender cómo la edad y la exposición a factores afectan la transformación.

Exposición a factores de riesgo

- **Pancreatitis crónica:** inducida mediante la administración de ceruleína, que provoca inflamación pancreática simulando la enfermedad humana.
- **Tabaquismo:** mediante la administración de nicotina.
- **Consumo de alcohol:** mediante suministro controlado de etanol.
- **Dieta rica en grasas:** para modelar obesidad y sus efectos metabólicos. Los ratones serán divididos en grupos con combinaciones de mutación KRAS y exposición a estos factores, para evaluar su efecto individual y combinado.

Evaluación de la transformación tumoral

Se realizarán análisis histológicos para detectar la aparición de lesiones preneoplásicas (PanIN) y cambios en el tejido pancreático. Se estudiará la incidencia, la rapidez de aparición y la gravedad de estas lesiones.

Análisis molecular

Utilizaremos la técnica de secuenciación de ARN unicelular (single-cell RNA-seq) para conocer con detalle qué genes se expresan en cada célula acinar durante la transformación inducida por los factores de riesgo. Esto permitirá descubrir rutas de señalización y genes diana para terapias.

Estrategias preventivas y terapéuticas

Basándonos en los resultados moleculares, probaremos en ratones fármacos inhibidores que bloqueen las vías activadas por los factores de riesgo, evaluando si logran prevenir o retrasar la aparición de lesiones tumorales.

Identificación y validación de biomarcadores

Analizaremos plasma y heces de ratones para encontrar moléculas indicadoras de transformación temprana. Estos biomarcadores serán validados en muestras humanas obtenidas en colaboración con el Hospital Gregorio Marañón.

Resultados esperados y posibles impactos

- Demostrar que la mutación KRAS, sin un factor de riesgo, no provoca cáncer en células acinares adultas, pero que la exposición a inflamación, tabaquismo, alcohol o dieta grasa sí induce transformación.
- Identificar rutas moleculares específicas que se activan con cada factor, que pueden ser dianas para nuevos tratamientos.
- Validar en ratones inhibidores que bloqueen la progresión tumoral, abriendo camino a terapias preventivas.
- Proponer biomarcadores accesibles para el diagnóstico temprano que puedan salvar vidas.
- Contribuir a la reducción de la incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas, especialmente en población joven.

Resultados preliminares

De momento nos hemos centrado en los estudios de dieta grasa y aunque no es evidente que tenga un papel como factor de riesgo, sí que hemos observado que los tumores son mucho más agresivos. En este sentido, los tumores son más sarcomatoideos (Figura 2) y más invasivos (Figura 3). A nivel transcripcional encontramos importantes diferencias que actualmente estamos evaluando para entender las alteraciones que se han producido y poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas (Figuras 4 y 5).

Fig 2

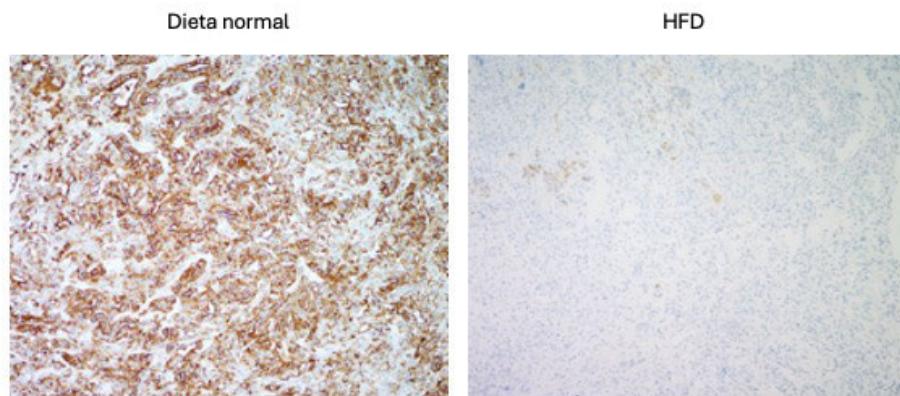


Figura 2: al microscopio podemos observar diferencias en los tumores desarrollados con dieta grasa. Mientras que los tumores de ratones alimentados con dieta normal expresan un marcador ductal (CK19, en marrón), los tumores de ratones alimentados con dieta grasa han perdido la expresión de este marcador. Esto indica que son tumores más desdiferenciados, más agresivos.

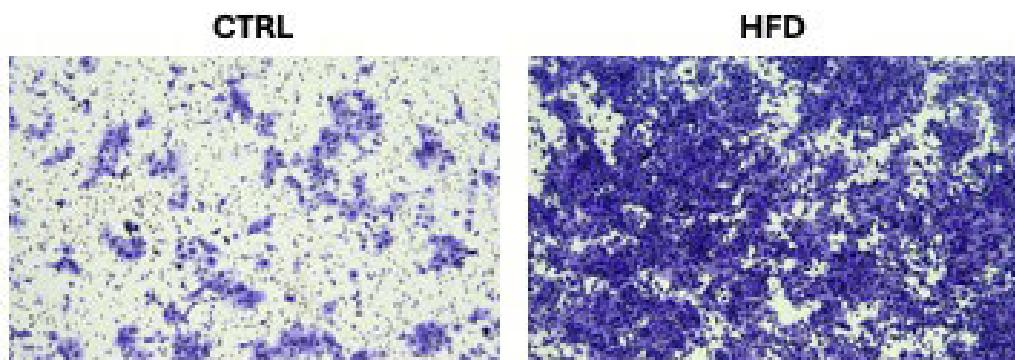


Figura 3: Los tumores de ratones alimentados con dieta grasa (HFD) son mucho más invasivos que los que se desarrollan bajo una dieta normal (CTRL). En la figura se muestra la capacidad de las células de atravesar una membrana. Esta capacidad es mayor en las células tumorales desarrolladas con dieta grasa. Esto significa que en presencia de dieta grasa los tumores son más agresivos y pueden dar lugar a metástasis.

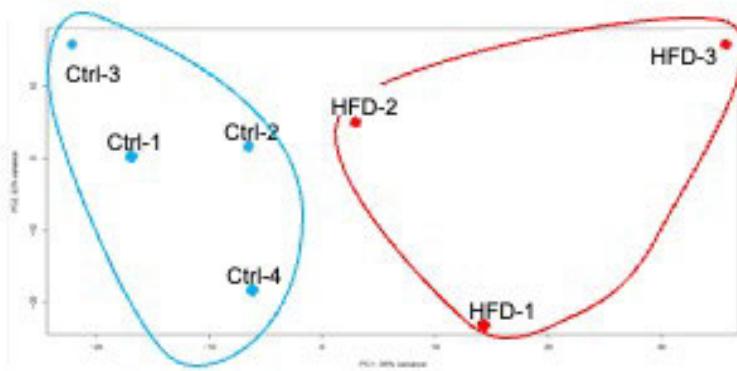


Figura 4: Las células tumorales desarrolladas en ratones alimentados con dieta grasa (HFD) y las que se desarrollan en ratones alimentados con una dieta normal (Ctrl) son muy diferentes también a nivel de expresión de genes. En la figura se puede ver cómo se agrupan las muestras tumorales Ctrl (azul) entre sí, separadas de las HFD (rojas).

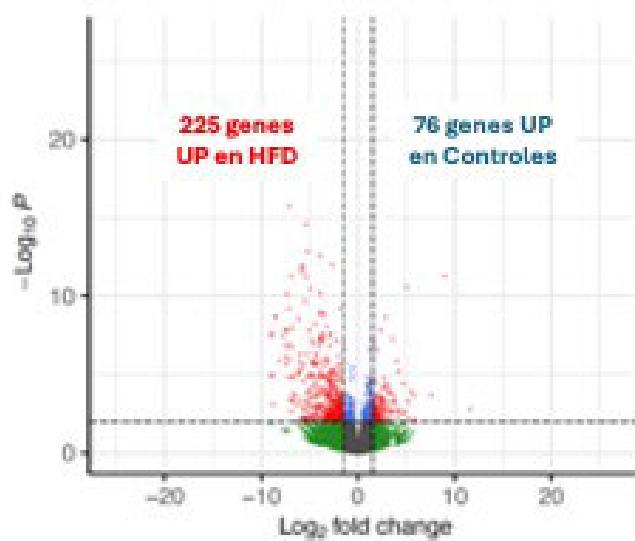


Figura 5: En un análisis más detallado, se puede ver el número de genes diferencialmente expresados entre las células tumorales desarrolladas en ratones alimentados con dieta grasa (HFD) y las que se desarrollan en ratones alimentados con una dieta normal (controles). Futuros estudios establecerán la relevancia de estos genes.

Conclusiones

mortalidad del cáncer de páncreas. Al entender cómo factores ambientales y de estilo de vida interactúan con mutaciones genéticas para iniciar el cáncer, podemos avanzar hacia métodos de detección precoz y tratamientos personalizados más efectivos.

La combinación de un modelo animal que reproduce la patología humana, técnicas moleculares avanzadas y colaboración clínica nos permite traducir los hallazgos a la práctica médica en un futuro cercano. De este modo, esperamos contribuir significativamente a mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de páncreas, impactando positivamente en la vida de miles de personas.



Beca 2024 (Clínica)

Victoria García Ortiz:

Ma Victoria García Ortiz (Córdoba, 1976), es licenciada en Biología y doctora en Genética por la Universidad de Córdoba. Actualmente es investigadora senior del grupo Nuevas Terapias en Cáncer en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

A lo largo de su carrera científica, ha centrado su investigación en el estudio de los mecanismos de mantenimiento del genoma y el epigenoma de los seres vivos, incluyendo las plantas —durante su tesis doctoral— y los humanos —en su etapa postdoctoral—.

Ha realizado estancias de investigación tanto en centros nacionales, como el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) o el Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología (CINN), como en instituciones internacionales, entre ellas el Departamento de Toxicología Ambiental y Molecular de la Universidad Estatal de Oregón o el Instituto de Radiobiología Celular y Molecular de París.

Convencida de que no puede haber avance científico sin que la información de sus resultados sea accesible para toda la sociedad, ha orientado parte de su trayectoria profesional hacia la divulgación científica, la cual considera complementaria, pero igualmente crucial, a la labor investigadora. Ha sido editora de una veintena de libros de divulgación científica, con los que ha buscado tender puentes entre el mundo científico y la sociedad, contribuyendo a traducir ideas complejas en narrativas comprensibles, rigurosas y atractivas para todo tipo de lectores.

TITULO:

Análisis de la metilación del ADN en biopsia líquida para la monitorización y manejo de pacientes con cáncer de páncreas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: María Victoria García Ortiz

Cáncer de páncreas y biopsia líquida: una nueva esperanza

El cáncer de páncreas es uno de los más agresivos y mortales: es la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa y tiene una de las tasas de supervivencia más bajas (solo el 9% de los pacientes vive más de cinco años). Esto se debe a que suele detectarse tarde, no presenta síntomas en etapas iniciales y responde mal a los tratamientos actuales.

La mayoría de los pacientes ya tienen la enfermedad avanzada cuando se les diagnostica, y aunque en algunos casos es posible operar, muchos recaen rápidamente. El tipo más común es el adenocarcinoma ductal pancreático, el cual presenta alteraciones genéticas como mutaciones en el gen KRAS en más del 90% de los casos.

Hasta ahora, el diagnóstico requiere técnicas invasivas como biopsias con aguja, que pueden ser difíciles y a veces no proporcionan suficiente información. Un marcador en sangre llamado CA19-9 se utiliza con frecuencia, pero tiene muchas limitaciones y puede dar resultados poco claros.

Frente a estas dificultades, la biopsia líquida se presenta como una alternativa prometedora. Esta técnica permite obtener información sobre el tumor a través de una simple muestra de sangre, analizando fragmentos de ADN que circulan libremente. Estos fragmentos provienen de células tumorales que mueren, y se ha observado que en pacientes con cáncer de páncreas son más abundantes y más pequeños que en personas sanas o con enfermedades benignas del páncreas.

La cantidad y el tamaño de estos fragmentos de ADN se han relacionado con el pronóstico: a mayor concentración y fragmentación, peor es la evolución del paciente. También se pueden detectar mutaciones específicas como las del gen RAS, que indican una enfermedad más agresiva.

Otro aspecto innovador es el análisis de metilación del ADN, un tipo de alteración epigenética. Este tipo de cambios no modifica el contenido genético, pero sí afecta cómo se comportan las células. Detectar patrones anormales de metilación en el ADN libre circulante podría ayudar a diagnosticar el cáncer de forma más precisa y predecir su evolución. Sin embargo, aunque se han identificado varios genes candidatos, todavía no hay suficientes estudios para aplicar este método de forma rutinaria en el cáncer de páncreas.

En resumen, la biopsia líquida —y especialmente el análisis de metilación del ADN libre circulante— es una herramienta prometedora para detectar el cáncer de páncreas, seguir su evolución y adaptar mejor los tratamientos. Su carácter no invasivo y su capacidad para reflejar los cambios del tumor en tiempo real la convierten en una opción muy valiosa, aunque aún se necesita más investigación para aplicarla plenamente en la práctica clínica.

¿Cuál es la idea principal del estudio?

La hipótesis de este proyecto parte de una propuesta innovadora: usar la biopsia líquida para estudiar el ADN del tumor que circula en la sangre, centrándose en un tipo particular de modificación llamada metilación. Este método, no invasivo y fácil de aplicar, podría ofrecer información muy útil sobre el cáncer, especialmente en el cáncer de páncreas más común (adenocarcinoma ductal pancreático), donde es muy difícil obtener muestras fiables del tumor por medios tradicionales.

Además, esta técnica podría ayudarnos a entender cómo evoluciona el tumor, cómo responde a los tratamientos y cómo se vuelve resistente a ellos. Sin embargo, hasta ahora se han hecho muy pocos estudios en cáncer de páncreas que analicen estas modificaciones en el ADN tumoral presente en la sangre.

¿Qué se busca conseguir con este proyecto?

El **objetivo general** del estudio es desarrollar nuevas herramientas basadas en biopsia líquida que permitan:

- Detectar con más precisión el cáncer de páncreas metastásico.
- Saber qué pacientes tienen un pronóstico peor.
- Predecir cómo responderán los pacientes al tratamiento.

Los **objetivos específicos** son:

- Evaluar el valor pronóstico del perfil de metilación del ADN en sangre en pacientes con cáncer de páncreas metastásico, y ver cómo se relaciona con otros parámetros como la cantidad y el tamaño de estos fragmentos de ADN, y la presencia de ciertas mutaciones (como las del gen RAS) al momento del diagnóstico.
- Estudiar si este perfil de metilación puede predecir la respuesta al tratamiento durante la evolución del cáncer, y analizar de nuevo su relación con la cantidad y fragmentación del ADN libre circulante y con las mutaciones en RAS.
- Identificar regiones específicas del ADN que están alteradas (metiladas) en estos pacientes, tanto al inicio de la enfermedad, como cuando esta progresó o responde al tratamiento.

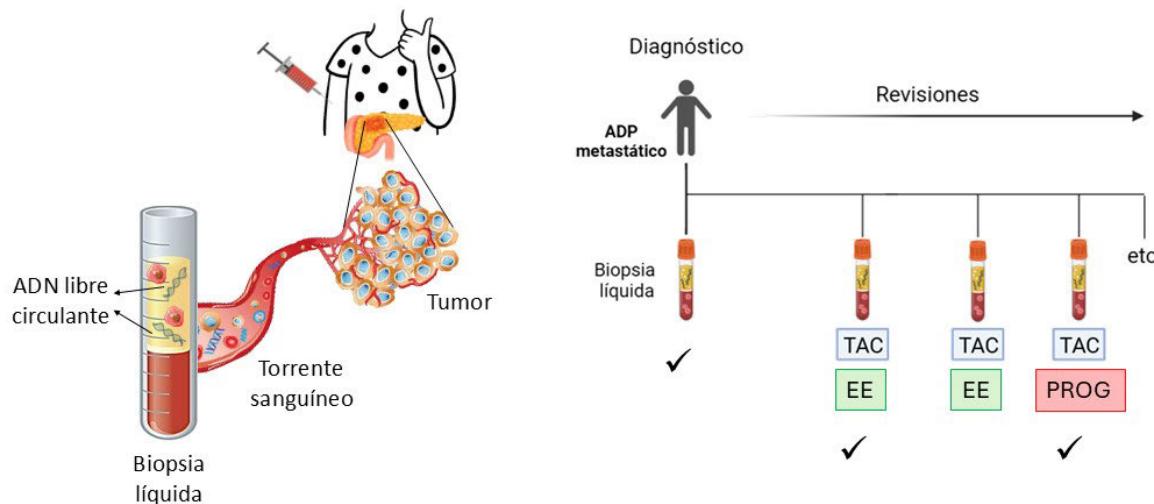
¿Cómo se lleva a cabo este estudio?

¿Quiénes participarán?

El estudio incluye a 32 pacientes con cáncer de páncreas metastásico, atendidos en el Hospital Universitario Reina Sofía. Estos pacientes son mayores de 18 años, diagnosticados con estadio IV de la enfermedad y han firmado su consentimiento informado.

Se recogen muestras de sangre en tres momentos clave:

1. Al momento del diagnóstico.
 2. Durante el tratamiento, coincidiendo con los estudios de TAC para ver la evolución del tumor.
 3. En caso de que la enfermedad progrese.
- En total, se analizan unas 96 muestras de sangre (3 por paciente)



¿Qué se hace con las muestras?

Las muestras de sangre se procesan para extraer el ADN libre en sangre. Este ADN se analiza desde varios enfoques:

1. Cantidad y tamaño del ADN: Se mide cuánto ADN libre circulante hay en cada muestra y qué tamaño tienen los fragmentos. Esto da pistas sobre la agresividad del tumor.
2. Mutaciones en el gen RAS: Se buscan mutaciones clave en el ADN tumoral que se sabe que están relacionadas con un peor pronóstico.

3. Metilación del ADN: Esta es una modificación química del ADN que afecta su funcionamiento sin cambiar la secuencia. Es un tipo de "marca epigenética" que puede indicar si un gen está activo o no.

¿Cómo se analiza la metilación?

Para detectar estas marcas, el ADN se somete a un tratamiento químico especial que permite diferenciar entre zonas metiladas y no metiladas. Luego, se usa una tecnología avanzada llamada microarrays, que puede analizar cientos de miles de regiones del ADN al mismo tiempo. Esto se hace en tres fases por paciente:

- Al diagnóstico.
- Cuando la enfermedad está estable.
- Si el cáncer progresiona durante el tratamiento.

Una vez detectadas las zonas del ADN que presentan metilación anormal, se seleccionan las más importantes y se vuelven a analizar con otra técnica más precisa llamada PCR digital, que permite confirmar estos resultados incluso cuando hay muy poco ADN.

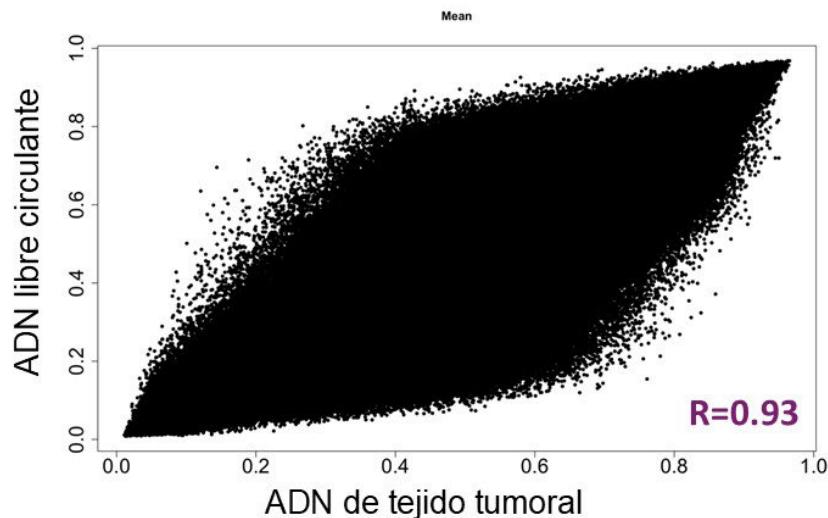
¿Qué se espera conseguir?

- Identificar marcadores epigenéticos en sangre que permitan saber cómo está evolucionando el cáncer.
- Detectar de forma temprana si el tratamiento está funcionando o no.
- Encontrar nuevas formas de predecir la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de páncreas metastásico.

¿Qué resultados hemos obtenido?

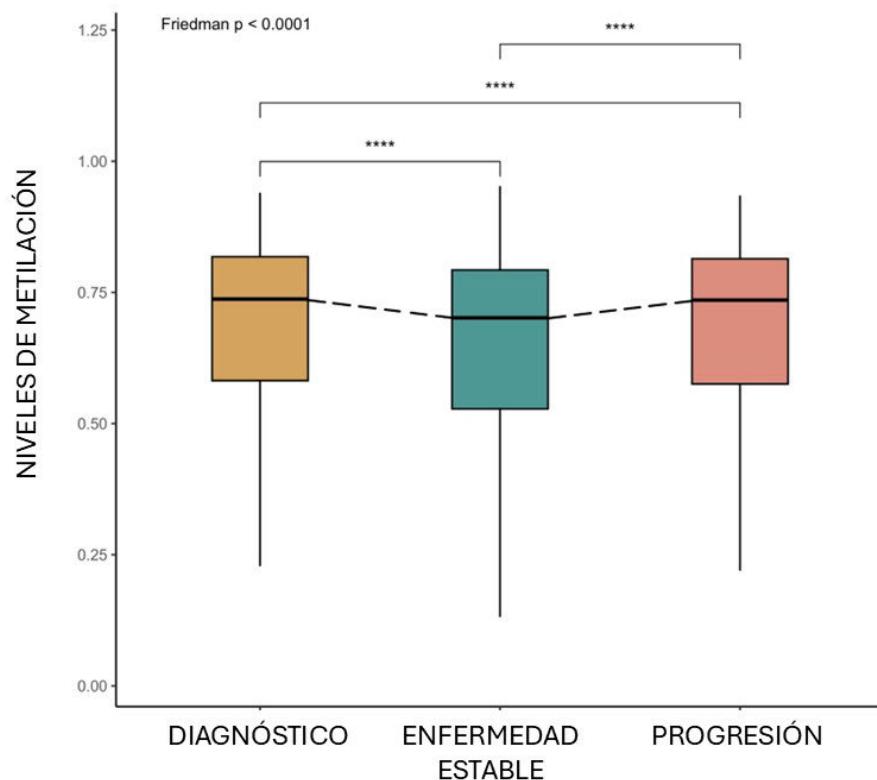
Tras analizar la metilación mediante microarray tanto de ADN obtenido de tejido tumoral como de ADN libre circulante obtenido de la sangre en 10 pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas hemos visto que las marcas de metilación detectadas en la sangre coinciden en gran medida con las encontradas en el tejido del tumor al momento del diagnóstico.

Esta coincidencia, conocida como alta concordancia, se mide mediante un valor llamado "R", que proviene de un análisis estadístico de correlación. Un valor de R cercano a 1 indica una fuerte similitud entre ambos tipos de muestras. En nuestro caso, el valor de R obtenido es 0,93. Esto significa que los análisis realizados con una simple muestra de sangre pueden reflejar de manera confiable lo que está ocurriendo en el tumor, lo que abre la puerta a métodos menos invasivos para detectar, seguir y entender el cáncer en tiempo real.



También hemos descubierto que estas marcas epigenéticas cambian de forma notable a lo largo del tratamiento: durante la fase estable de la enfermedad, cuando el tratamiento está funcionando, hay una disminución general en la metilación (hipometilación).

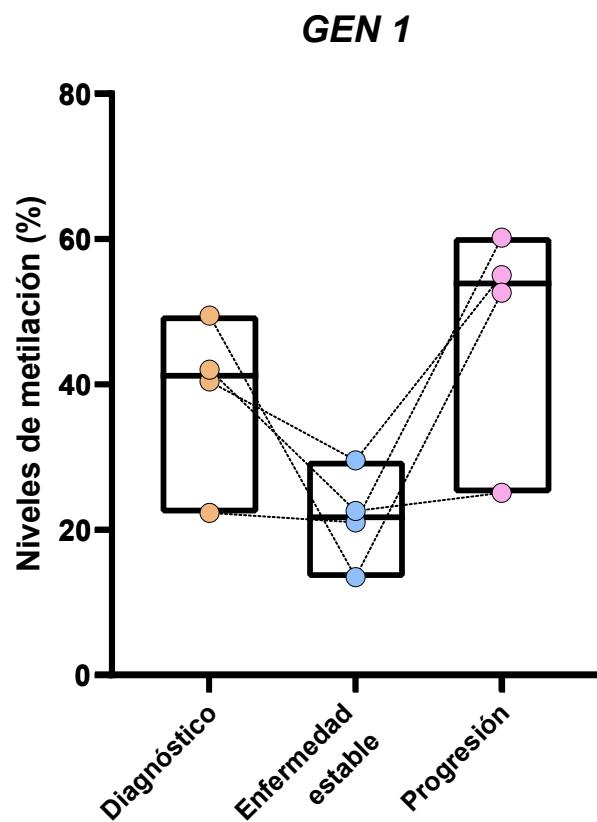
En cambio, en el momento del diagnóstico y cuando el tumor progresiona, los niveles de metilación aumentan notablemente (hipermethylación) y los patrones se parecen mucho entre sí. Este hallazgo es importante porque sugiere que los cambios en la metilación podrían servir como un indicador dinámico del estado del cáncer, ayudando a evaluar la respuesta al tratamiento y a detectar posibles recaídas de manera no invasiva.



En resumen, identificamos 6743 sitios en el genoma cuya metilación es similar en los momentos de diagnóstico y progresión de la enfermedad, pero diferente en los casos de enfermedad estable. De estos, 1838 están asociados a genes conocidos: 1324 de ellos presentan una mayor metilación y 514 una menor metilación en diagnóstico y progresión, en comparación con la enfermedad estable.

En la actualidad, a partir de los datos obtenidos en el microarray de metilación, estamos analizando los niveles de metilación de algunos de estos genes que han mostrado cambios a lo largo de la evolución de la enfermedad, en esta ocasión mediante PCR digital que permite analizar con alta sensibilidad zonas específicas del genoma y así confirmar los resultados en una cohorte de pacientes mayor. En cada paciente se analizan las muestras de plasma extraídas al diagnóstico, tras el inicio de tratamiento y coincidente con enfermedad estable según TAC, y cuando la enfermedad ha progresado.

Los resultados preliminares de uno de los genes seleccionados muestran que efectivamente hay un descenso de la metilación cuando los pacientes son tratados y se encuentran en enfermedad estable, y que esa metilación vuelve a aumentar en la progresión de la enfermedad, incluso por encima de los niveles que tenían en el momento del diagnóstico.



En este momento estamos analizando más genes y más pacientes para validar los resultados del microrarray de metilación. A su vez estamos analizando la capacidad de algunos de estos genes para predecir la respuesta a terapia. En este sentido, hemos obtenido resultados muy prometedores, observando cómo los niveles basales (al diagnóstico) de metilación de uno de estos genes predijeron la respuesta al tratamiento de primera línea basado en FOLFIRINOX con una sensibilidad y especificidad bastante elevados. La puesta en marcha de estos marcadores en la rutina clínica ayudaría en gran medida a la personalización de las estrategias terapéuticas de primera línea.

Con todos estos resultados, aunque aún preliminares, podemos concluir que los biomarcadores basados en biopsia líquida, y en particular los biomarcadores epigenéticos circulantes, podrían convertirse en un futuro próximo en herramientas de gran utilidad para monitorizar la evolución del cáncer, detectar de forma temprana la eficacia del tratamiento e incluso ayudar a determinar la terapia más adecuada en cada etapa de la enfermedad en pacientes con cáncer de páncreas metastásico.



Beca 2025 (Básica)

José Yélamos López:

José Yélamos López, natural de Bayarque (Almería), es Licenciado en Biología por la Universidad de Granada (1985) y Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla (1993).

Fue número uno en el examen BIR en 1986 y se especializó en Inmunología en el Hospital Universitario “Virgen del Rocío” (Sevilla). Realizó una estancia postdoctoral de seis años en el laboratorio del Dr. César Milstein en el MRC-Laboratory of Molecular Biology (Cambridge, Reino Unido).

Ha sido investigador en instituciones como el Hospital “Virgen de la Arrixaca” (Murcia), el CNRS (Estrasburgo, Francia) y la Universidad de Murcia. Desde 2007, es Adjunto de Inmunología en el Hospital del Mar (Barcelona) y dirige un grupo de investigación en el Hospital del Mar Research Institute.

TITULO:

Aprovechando las funciones inmunomoduladoras de PARP-2 para combatir el cáncer de páncreas

INVESTIGADOR PRINCIPAL: José Yélamos López.

Centro de realizacion: Hospital del Mar Research Institute. Barcelona

Antecedentes:

El cáncer de páncreas es uno de los tumores más agresivos, situándose como la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer. Esta agresividad está estrechamente asociada a varios factores, entre ellos un estroma denso y fibrótico, un entorno intensamente hipóxico y un microambiente inmunosupresor, lo que representa un obstáculo importante para controlar su progresión, confiriendo resistencia a los diferentes tratamientos, incluyendo una falta de respuesta a la inmunoterapia.

Los componentes celulares responsables de la inmunosupresión en el microambiente del cáncer de páncreas incluyen células T reguladoras, células mieloides supresoras y macrófagos asociados al tumor que inhiben la respuesta inmune frente al mismo. Es importante destacar que el pequeño porcentaje de pacientes con cáncer de páncreas que presentan una larga supervivencia exhiben una respuesta inmune activa frente al tumor, poniendo de manifiesto la importancia de dicha respuesta en el control de la progresión del cáncer de páncreas.

Por ello, es muy importante desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan cambiar el entorno inmunológicamente inactivo presente en el cáncer de páncreas (lo que se denomina un tumor inmunológicamente “frio”) por un entorno tumoral con componentes inmunológicos activos frente al tumor (lo que se denomina un tumor inmunológicamente “caliente”).

Las principales alteraciones genéticas en el cáncer de páncreas incluyen mutaciones en un gen denominado KRas, junto con otras alteraciones genéticas en diferentes genes supresores de tumores como p53. Asimismo, diversos estudios también indican que alteraciones en otro gen denominado c-Myc desempeña un papel crucial en la iniciación, mantenimiento y progresión metastásica del cáncer de páncreas. Es importante señalar que las alteraciones en los genes KRas y c-Myc, que inducen su activación, son impulsores clave de un proceso denominado estrés de replicación que tiene lugar en células que se dividen muy rápido, lo que puede favorecer la tumorigénesis al inducir inestabilidad genómica y daño en el ADN.

Como consecuencia, el cáncer de páncreas exhibe uno de los niveles más altos de estrés replicativo entre los distintos tumores, lo cual promueve su progresión, pero también puede representar una vulnerabilidad que podemos utilizar para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, los inhibidores farmacológicos dirigidos a alterar la respuesta al daño del ADN, como hacen los inhibidores de PARP-1/PARP-2 (PARPi), ofrecen vías terapéuticas prometedoras.

PARP-1 y PARP-2 son las dos enzimas de la familia de proteínas denominada Poli(ADP-ribosa) polimerasas (PARP) que, en respuesta al daño en el ADN, catalizan la escisión de la nicotinamida adenina dinucleótido (β -NAD) para transferir residuos de ADP-ribosa a diversas proteínas receptoras, generando largas cadenas de poli(ADP-ribosa).

Esta modificación transitoria de las proteínas altera su función biológica permitiendo, por ejemplo, su participación en la respuesta al daño en el ADN. Dado el papel de PARP-1 y de PARP-2 en la respuesta al daño del ADN, los PARPi se han establecido como nuevas terapias oncológicas para pacientes con tumores deficientes en una vía de reparación del ADN denominada recombinación homóloga (HR), como son los pacientes portadores de mutaciones en unas proteínas importantes en esta vía de reparación denominadas BRCA1 BRCA2. En diciembre de 2019, tras los resultados de un ensayo clínico denominado POLO, la FDA y la EMA aprobaron el uso clínico del PARPi olaparib como tratamiento de mantenimiento para pacientes con cáncer de páncreas metastásico con mutaciones germinales en BRCA1/2 que no progresaron durante la quimioterapia basada en platino. Sin embargo, estos pacientes representan menos del 5% de los casos de cáncer de páncreas, y aún en ellos, la eficacia es muy limitada.

A pesar de que existen numerosos estudios que nos indican que las proteínas PARP-1 y PARP-2 llevan a cabo diferentes funciones biológicas, todos los PARPi actualmente aprobados para uso clínico (olaparib, niraparib, rucaparib y talazoparib) no discriminan entre PARP-1 y PARP-2. Sin embargo, estas funciones diferenciadas podrían tener un impacto en la oncogénesis. De hecho, nuestro grupo ha demostrado recientemente que PARP-1 y PARP-2 ejercen efectos opuestos en el desarrollo de linfomas B promovidos por la desregulación de c-Myc en modelos experimentales murinos. Así, la pérdida de PARP-2 retrasa el desarrollo de los linfomas, mientras que la deficiencia de PARP-1 acelera la linfomagénesis. De manera similar, trabajos de otros grupos han demostrado que la inhibición selectiva de PARP-2 reduce el crecimiento del cáncer de próstata.

En el caso del cáncer de páncreas, nuestro grupo ha demostrado que la eliminación por métodos genéticos del gen que codifica a la proteína PARP-1 no afecta significativamente la progresión tumoral ni la supervivencia global en un modelo de cáncer de páncreas en ratón. En contraste, la eliminación del gen que codifica a PARP-2 retrasa significativamente la progresión tumoral en modelos murinos de cáncer pancreático inducidos tanto por alteraciones genéticas del oncogen c-Myc como del oncogen KRas. Los estudios de expresión génica en estos modelos nos revelaron que la pérdida de PARP-2 se asocia con la activación de vías relacionadas con la respuesta inmune antitumoral y con un aumento en la inestabilidad genómica. Así, el análisis del microambiente tumoral mostró que la eliminación de PARP-2 provoca un incremento significativo en la infiltración tumoral de células inmunes con actividad anti-tumoral como son las células T CD4⁺ y CD8⁺, así como células NK, acompañado de una reducción en células inmunes con funciones inmunosupresoras como son las células T reguladoras y los macrófagos asociados a tumor.

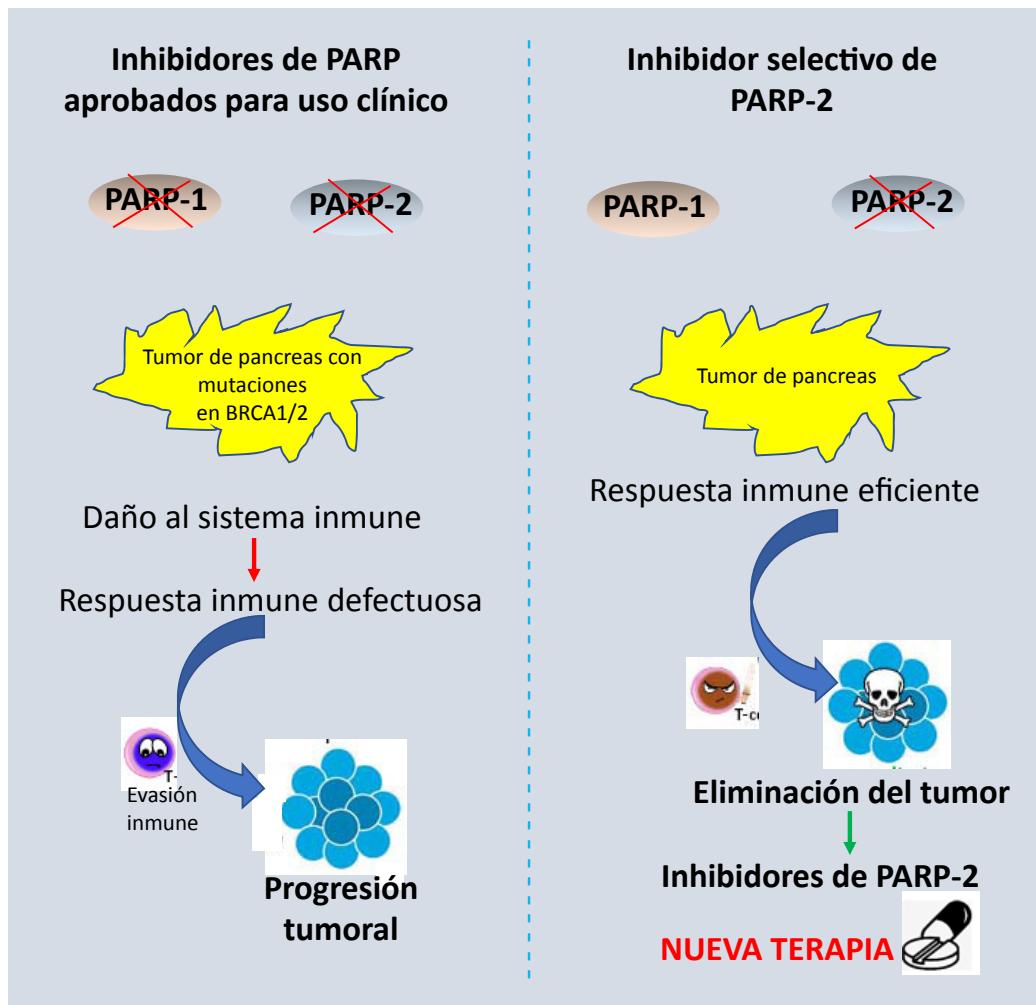
Estos hallazgos indican que PARP-2 ejerce una función inmunomoduladora en el cáncer de páncreas a través de mecanismos aún desconocidos. Uno de los objetivos del proyecto actual es investigar estos mecanismos, que podrían involucrar tanto una modulación directa sobre la función de las células inmunes como efectos indirectos mediados por alteraciones en las células tumorales que impactan en la interacción célula tumoral–sistema inmune.

En conjunto, nuestros resultados demuestran un papel crítico de PARP-2 en el cáncer de páncreas y abren nuevas oportunidades terapéuticas. En particular, **nuestra propuesta es que la inhibición selectiva de PARP-2 representa un enfoque novedoso para potenciar la respuesta inmune frente al cáncer de páncreas y, de esta forma, controlar su progresión.**

De hecho, la modulación del sistema inmunitario mediante inhibidores de moléculas pequeñas dirigidas a vías de señalización intracelular podría constituir una estrategia revolucionaria, complementaria y potencialmente sinérgica con las inmunoterapias existentes. Un objetivo central de este proyecto es determinar si los efectos inmunomoduladores observados mediante la eliminación genética de PARP-2 pueden reproducirse farmacológicamente, y cómo estas intervenciones afectan la progresión del cáncer de páncreas.

Sin embargo, el desarrollo de inhibidores selectivos de PARP-2 aún se encuentra en fases muy iniciales. El primer compuesto reportado, UPF-1069, presenta una potencia y selectividad limitadas (IC_{50} de 0,3 μ M para PARP-2 y 8 μ M para PARP-1), lo cual restringe su uso en modelos preclínicos e impide su aplicación clínica. Recientemente, en colaboración con la Fundación Kaertor, a través del programa Cancer Innova, hemos desarrollado un inhibidor altamente potente y selectivo de PARP-2, denominado PCI058-0226. Este compuesto, apto para administración intraperitoneal, muestra un IC_{50} de 2,5 nM para PARP-2 y una selectividad >1000 veces superior frente a PARP-1. Cabe destacar que PCI058-0226 ha demostrado actividad inmunomoduladora *in vivo*, mejorando la inmunidad antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama inducido por PyMT-MMTV. Uno de los objetivos centrales del presente proyecto es evaluar el potencial terapéutico de este inhibidor selectivo de PARP-2 en el cáncer de páncreas, específicamente su capacidad para modular la respuesta inmune e impedir la progresión tumoral. Este trabajo proporcionará evidencia preclínica crucial para respaldar el desarrollo de inhibidores selectivos de PARP-2 como agentes inmunomoduladores en cáncer de páncreas.

En resumen, sobre la base de estos resultados previos, proponemos estudiar los mecanismos intrínsecos asociados a las funciones inmunomoduladoras de PARP-2 en el cáncer de páncreas y de cómo podemos aprovechar dichas funciones para combatir esta enfermedad. El enfoque propuesto en este proyecto abarca una adecuada transición desde los estudios básicos, a través de modelos animales y análisis en organoides derivados de pacientes (PDOs), con el fin de descubrir nuevas oportunidades terapéuticas que permitan un mejor manejo clínico de los pacientes. En conjunto, consideramos que nuestros trabajos preliminares respaldan la idea principal de este proyecto y que estamos preparados para abordar los objetivos propuestos en el plazo establecido. La ejecución de este proyecto aumentará significativamente las posibilidades de identificar nuevas terapias en cáncer, trasladando el conocimiento básico hacia aplicaciones clínicas.



Equipo Investigador

Este Proyecto será llevado a cabo por un equipo científico multidisciplinar formado por investigadores básicos y clínicos ubicados en el Hospital del Mar (Barcelona) y en el Hospital del Mar Research Institute. Los participantes del equipo investigador son:

Dr. José Yélamos, Investigador Principal del grupo de investigación "Poly(ADP-ribose) Polymerases" en el Hospital del Mar Research Institute y Adjunto de Inmunología en el Hospital del Mar desde 2007. Nuestro grupo es reconocido internacionalmente en el estudio de la biología de PARP-1 y de PARP-2 y su impacto en la respuesta inmune anti-tumoral.

Dra. Pilar Navarro, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e Investigadora Principal del grupo de investigación "New Cancer Molecular Targets" en la Unidad Mixta entre el CSIC y el Hospital del Mar Research Institute, con más de 20 años de experiencia en la investigación en cáncer de páncreas y contribuciones de relevancia en la identificación y caracterización de nuevas dianas moleculares en el cáncer de páncreas.

Dr. Neus Martínez-Bosch, Investigadora post-doctoral Senior del Hospital del Mar Research Institute, con amplia experiencia en modelos in vitro e in vivo de cáncer de páncreas y el desarrollo de PDOs, crucial para la validación de nuevas estrategias terapéuticas.

Los integrantes clínicos del Hospital del Mar que componen el equipo investigador incluyen al **Dr. Luis Barranco**, Jefe de la Sección de Endoscopia Digestiva, **Dr. Fernando Burdío**, Jefe del Servicio de Cirugía General, **Dr. Patricia Sánchez**, Adjunta de Cirugía, **Dr. Laura Visa**, Adjunta de Oncología, **Dr. Mar Iglesias**, Jefa del Servicio de Anatomía Patológica. La experiencia clínica de todos ellos en la patología del cáncer de páncreas contribuirá muy significativamente a la consecución de los objetivos propuestos.

El equipo investigador también incluye tres estudiantes de doctorado: Núria Vázquez, Bennett Nickell y Marina Junyent; y dos técnicas de laboratorio: Coral Ampurdanés y Dulce Soto, esenciales para el desarrollo de todos los aspectos técnicos del proyecto.

Hipótesis de trabajo y objetivos

El cáncer de páncreas, al igual que otros tumores denominados inmunológicamente “fríos”, se caracteriza por un entorno inmunosupresor con muy pocas células inmunes efectoras, lo que favorece la progresión tumoral y previene la eficacia de la inmunoterapia. Por tanto, es muy importante desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que faciliten el reclutamiento de células inmunes con función efectora y limite las células inmunosupresoras en el microambiente tumoral y, de esta forma, conviertan a un tumor “frío” en un tumor “caliente” desde el punto de vista inmunológico.

El objetivo de las nuevas estrategias terapéuticas basadas en la inmunoterapia es precisamente revertir la tolerancia inmune frente a los tumores tanto modulando señales de correceptores de células T como impulsando el reconocimiento de antígenos asociados a tumores mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Además de estas aproximaciones basadas en estrategias biológicas, la modificación de la respuesta inmune utilizando pequeñas moléculas químicas que van dirigidas a modificar algunas de las rutas de señalización intracelular, puede representar un avance complementario y potencialmente sinérgico con la inmunoterapia.

Las proteínas PARP-1 y PARP-2 están implicadas en mantener la estabilidad del genoma, aunque tienen funciones biológicas diferentes e impactan de forma diferente en la carcinogénesis. Es importante resaltar que estas dos proteínas no solo juegan un papel en la célula tumoral, sino que también modulan la respuesta inmune frente al tumor de una forma diferente, lo que puede contribuir a su efecto opuesto en la progresión tumoral.

Basándonos en la función de regulación de la respuesta inmune por PARP-2 y a nuestros datos en modelos preclínicos de cáncer en ratón, **nuestra hipótesis es que la inhibición específica de PARP-2, pero no la de PARP-1, revierte el microambiente inmunosupresor presente en el cáncer de páncreas hacia una respuesta inmune efectora frente al tumor.** Para demostrar esta hipótesis, proponemos los siguientes objetivos:

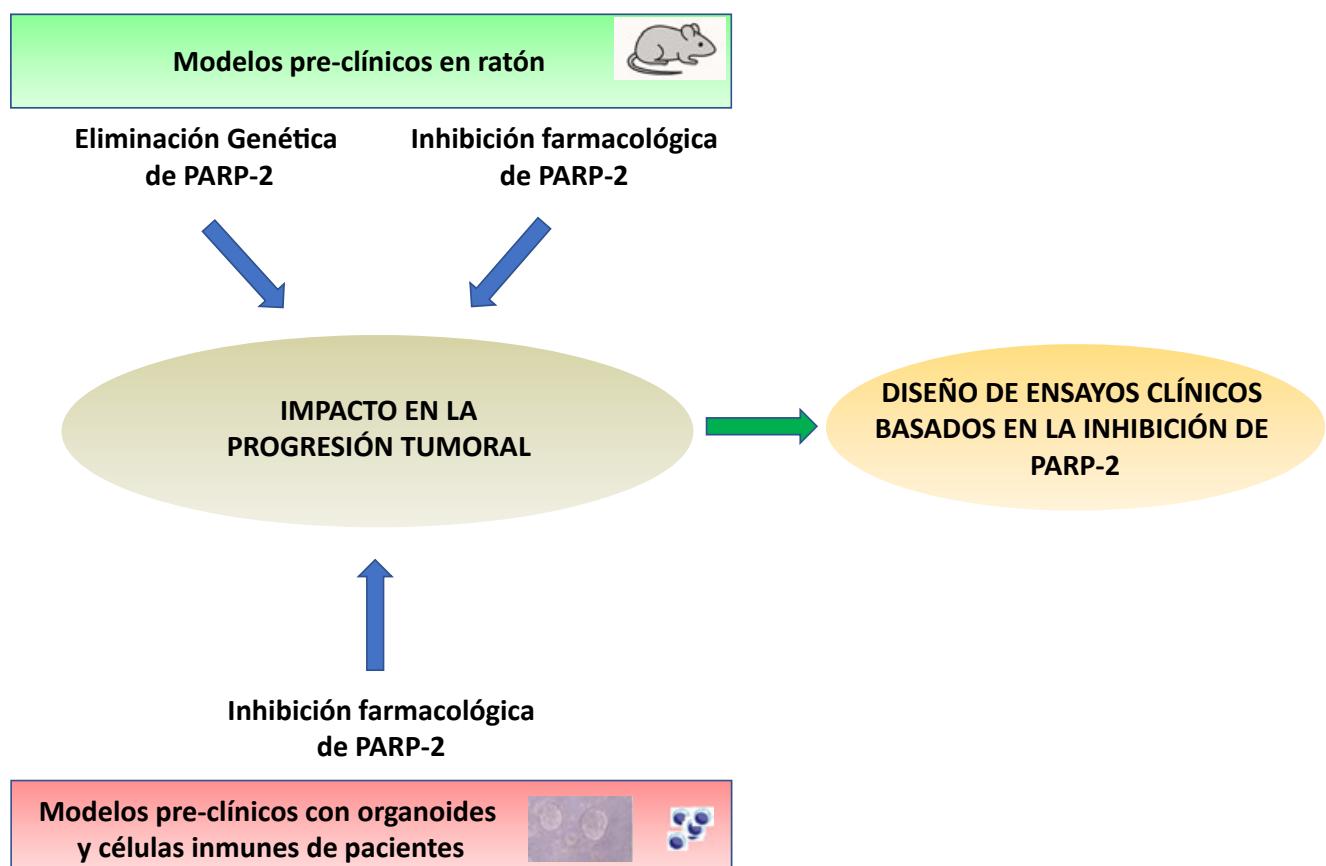
1. Estudiar como la inhibición genética y farmacológica de PARP-2 modula la interacción entre las células tumorales y las células inmunes y su impacto en la progresión tumoral en modelos pre-clínicos de cáncer de páncreas en ratón.

2. Evaluar *in vitro* terapias basadas en la inhibición selectiva de PARP-2 en organoides 3D generados a partir de tumores de páncreas en presencia de células inmunes del propio paciente.
3. Con los datos obtenidos, proponemos diseñar ensayos clínicos basados en la inhibición selectiva de PARP-2.

Metodología

Para la consecución de los objetivos propuestos utilizaremos la siguiente metodología.

Modelos preclínicos en ratón



Para los estudios pre-clínicos en ratón, implantaremos células tumorales (procedentes de tumores generados de forma espontánea en ratones que tienen mutaciones en KRas y en c-Myc), en el páncreas de ratones con un sistema de histocompatibilidad idéntico a las células tumorales para evitar el rechazo de estos tumores por mecanismos alogénicos diferentes a la propia respuesta inmune frente al tumor. Utilizaremos dos estrategias diferentes para estudiar el papel de la proteína PARP-2 en el cáncer de páncreas, una estrategia genética y una estrategia farmacológica.

En el caso de la estrategia genética, las células tumorales que utilizaremos serán células que contienen la proteína PARP-2 de forma natural y células tumorales a las que hemos eliminado, utilizando herramientas genéticas, dicha proteína. Estas células las implantaremos en el páncreas de ratones que contienen dicha proteína, así como en ratones en los que hemos eliminado, por métodos genéticos, PARP-2. En estos ratones, haremos un seguimiento del crecimiento tumoral y evaluaremos los mecanismos inmunológicos que han podido influir en las diferencias en la progresión entre los diferentes grupos experimentales.

En el caso de la estrategia farmacológica, las células tumorales que contienen la proteína PARP-2 de forma natural, las implantaremos en el páncreas de ratones. Estos ratones los trataremos farmacológicamente con inhibidores selectivos de PARP-2 generados en nuestro grupo de investigación para evaluar el impacto en la progresión tumoral que tienen dichos compuestos. Igualmente, estudiaremos como estos inhibidores afectan a la respuesta inmune frente al tumor. Los efectos de nuestros inhibidores selectivos frente a PARP-2 los compararemos con los efectos que puedan tener los inhibidores no selectivos de PARP-1/PARP-2 utilizados para el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas con mutaciones en BRCA1/2, así como con inhibidores selectivos de PARP-1 disponibles comercialmente.

Modelos preclínicos con organoides generados a partir de tumores de páncreas procedentes de pacientes

Las terapias farmacológicas estudiadas en los modelos de ratón las evaluaremos también en organoides 3D generados a partir de tumores de páncreas procedentes de pacientes en presencia del sistema inmune del propio paciente del que procede el tumor.

En primer lugar, evaluaremos el efecto de nuestros inhibidores sobre las propias células tumorales y sobre las propias células del sistema inmune por separado. Posteriormente, estudiaremos como afectan estos inhibidores a la interacción de las células tumorales con las células del sistema inmune.

Para estudiar sinergias de nuestros inhibidores de PARP-2 con tratamientos de inmunoterapia (anti-PD-1), realizaremos nuestros estudios tanto en presencia como en ausencia de estos agentes inmunoterapéuticos.

Diseño de ensayos clínicos basados en la inhibición selectiva de PARP-2

En base a los resultados de los modelos de ratón y los estudios en organoides, evaluaremos si la información obtenida nos puede llevar a proponer un estudio clínico con nuestro inhibidor selectivo de PARP-2 para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Beca 2025 (Clínica)



Leticia Moreira Ruiz:

Leticia Moreira Ruiz, MD, PhD. Especialista en Aparato Digestivo del Hospital Clínic de Barcelona.

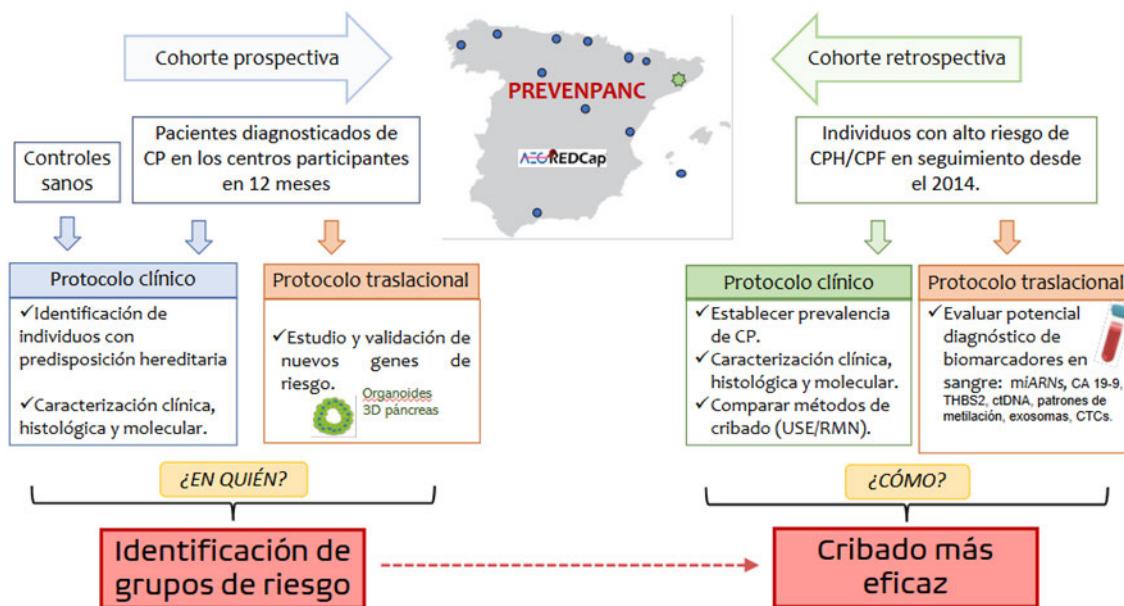
Desde 2009, la Dra. Moreira se ha dedicado, tanto a nivel asistencial como en su carrera investigadora, a la oncología digestiva, especialmente a los síndromes de predisposición hereditaria y a la prevención de estas neoplasias. Su interés en esta área se puede ver reflejado entre otros en la publicación de trabajos originales en revistas de prestigio, con una excelente producción científica. En 2015 fue galardonada con el Premio Ramón Margalef de la Universidad de Barcelona al mejor artículo científico derivado de una tesis doctoral. Posteriormente ha realizado un postdoctorado en neoplasias digestivas extracolónicas en la Universidad de Pennsylvania, donde tuvo la oportunidad de adquirir los conocimientos y habilidad en sistemas de vanguardia como cultivos 3D, organoides, modelos murinos, análisis bioinformáticos.

Mi interés en el área de la oncología digestiva se refleja en la publicación de trabajos originales en las revistas más prestigiosas de la especialidad (Clin Cancer Res 2011, JAMA 2012, Gut 2013, Cancer 2015, Developmental Cell 2018, Gastroenterology 2020, Clin Gastroenterol Hepatol 2020, Cancers 2020, IJMS 2021, IJC 2023, Cancers 2023, Gut 2024, Gastric Cancer 2024, Lancet GyH 2024, IJC 2025, Gut 2025, Endoscopy 2025), con una excelente producción científica. He participado activamente en la actualización de diferentes guías clínicas nacionales e internacionales sobre cáncer digestivo y formo parte de consorcios internacionales de investigación en cáncer pancreático y gástrico. Soy investigador del IDIBAPS desde 2013 y del CIBERehd desde 2015 y profesora asociada de la Facultad de Medicina de la UB. Actualmente tengo mi propia línea de investigación en el área de tumores digestivos y lidero 4 estudios multicéntricos sobre tumores digestivos extracolónicos en España y actual coordinadora del comité de cáncer digestivo hereditario en el Hospital Clínic de Barcelona.

TITULO:

“PREVENPANC. Estudio Multicéntrico Español para la Prevención del Cáncer de Páncreas”.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Leticia Moreira Ruiz



Resumen del estudio

Prevención del cáncer de páncreas: una oportunidad para detectar a tiempo

El cáncer de páncreas es uno de los tumores más agresivos y difíciles de diagnosticar a tiempo. Esto hace que muchas personas no tengan opciones de tratamiento cuando se descubre la enfermedad. Además, se espera que en los próximos años sea una de las principales causas de muerte por cáncer. En algunos casos, este tipo de cáncer aparece en familias con antecedentes genéticos. Identificar a las personas que tienen más riesgo por sus genes permite hacerles un seguimiento especial y detectar la enfermedad antes de que cause síntomas. También ayuda a proteger a otros miembros de la familia que aún están sanos.

Así, el estudio va enfocado en contestar dos preguntas ¿Quién tiene más riesgo de cáncer pancreático? (con la identificación de factores genéticos/familiares) y ¿Cómo hacer la prevención en estas personas de mayor riesgo de cáncer de páncreas? (con la identificación de biomarcadores, estudios radiológicos que nos permitan crear un modelo de riesgo y diagnóstico precoz de dicho tumor).

Para lograrlo, se ha puesto en marcha un estudio multicéntrico nacional con 24 hospitales españoles, con la red llamada PREVENPANC incluyendo a pacientes con cáncer pancreático, personas con riesgo aumentado de cáncer de páncreas por factores familiares/hereditarios y a personas sanas como grupo control para buscar diferencias genéticas y biológicas que permitan identificar a quienes tienen más probabilidad de desarrollar la enfermedad y diagnóstico precoz. El registro recoge información clínica, de pruebas realizadas y muestras de sangre para realizar estudios genéticos y analizar nuevos marcadores biológicos, como pequeñas moléculas llamadas microARN, que podrían servir como señales de alerta temprana.

El objetivo final es desarrollar un modelo de predicción de riesgo con inteligencia artificial, que incluya datos clínicos y biológicos que permita detectar el cáncer en sus primeras fases, cuando todavía se puede tratar. **PREVENPANC** unirá esfuerzos de profesionales sanitarios e investigadores, creando una base colaborativa sólida para investigaciones presentes y futuras.

En resumen, este proyecto busca cambiar la historia natural del cáncer de páncreas mediante la prevención, la detección precoz y la colaboración entre centros.

Antecedentes del tema

1. Adenocarcinoma de páncreas: Epidemiología, Etiología y Clasificación

El cáncer de páncreas (CP), adenocarcinoma ductal pancreático, es uno de los cánceres más agresivos y en su mayoría incurable al diagnóstico. Así, a pesar de los avances en los tratamientos, solo un 7% de los pacientes sobreviven 5 años tras su detección. A diferencia de otros cánceres sólidos –como el de mama o colorrectal–, el CP carece de estrategias de cribado sistemáticas en la población general, lo que subraya la necesidad de desarrollar métodos innovadores para su detección precoz.

El tabaquismo, alcoholismo, índice de masa corporal elevado y la diabetes mellitus son factores de riesgo para desarrollar CP. Hasta un 10% de los pacientes con CP presentan antecedentes familiares de esta neoplasia lo que indica el papel de factores genéticos en la patogenia de esta enfermedad. Al día de hoy no se ha identificado un principal gen causante del CP, pero existen mutaciones germinales que se asocian a mayor riesgo de presentar la neoplasia. Estos síndromes de cáncer hereditario representan el 3% de todos los CPs y el 10% de los CPs en pacientes <60años. Las alteraciones genéticas más frecuentes asociadas al cáncer de páncreas hereditario (CPH) son BRCA2, PALB2, ATM y CDKN2A/p16, entre otras (Anexo 1). Por otro lado, en el 7% de los casos existe agregación familiar sin mutación germinal identificada, situación conocida como cáncer de páncreas familiar (CPF), siendo mayor el riesgo cuanto mayor el número de familiares afectos^{1,2} (Tabla 1). En consecuencia, los programas de cribado enfocados en estas poblaciones de alto riesgo son esenciales para mejorar la detección temprana y, por ende, el pronóstico de la enfermedad.

Tabla 1. Síndromes hereditarios asociados a mayor riesgo de cáncer de páncreas.

Síndrome	Gen causal	Riesgo acumulado de CP	Riesgo relativo de CP
SPJ	<i>STK11/LKB1</i>	8-11% a los 70 años, hasta 36% a lo largo de la vida	132 veces
PH	<i>PRSS1/SPINK1, PRSS2, CTRC</i>	53% a los 75 años	26-87 veces
FAMMM	<i>P16/CDKN2A</i>	17% a los 75 años	13- 46,6 veces
	<i>BRCA1/</i>		<i>BRCA1: 4-6 veces</i>
HBOC	<i>BRCA2/</i>	1,5-4% a los 70 años (especialmente en <i>BRCA2</i>)	<i>BRCA2: 3,5-22 veces</i>
	<i>PALB2</i>		<i>PALB2: 6 veces</i>
PAF	<i>APC</i>	1,7% a los 80 años	4,5 veces
SL	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	3,7% a los 70 años	8,6 veces
SLF	<i>TP53</i>	<5%	-
AT	<i>ATM</i>	<5%	2,7 veces
FQ	<i>CFTR</i>	<5%	5,3 veces

CP, adenocarcinoma ductal pancreático; SPJ, síndrome de Peutz Jeghers; PH, pancreatitis hereditaria; FAMMM, Melanoma múltiple atípico familiar; HBOC, síndrome de mama y ovario hereditario; PAF, poliposis adenomatosa familiar; SL, síndrome de Lynch; SLF, síndrome de Li-Fraumeni; AT, Ataxia telangiectasia; FQ, fibrosis quística;

2. Diagnóstico de Cáncer de Páncreas hereditario

La indicación de estudio genético germinal tradicionalmente se basa en criterios clínicos de diferentes síndromes asociados seguido de la confirmación con una prueba genética3. En los últimos años este enfoque ha cambiado por uno menos restringido con una tendencia a apoyar el uso de paneles multigén a todo paciente con CP independiente de la edad de diagnóstico o antecedentes familiares de cáncer, o al menos utilizarlo en pacientes jóvenes con CP. A pesar de ello, en un porcentaje elevado de familias con CP, no se identifica ninguna causa genética subyacente. En este contexto, el grupo de trabajo del proyecto ha identificado en estudios previos realizados en pacientes <60años con CP asociados a síndrome hereditario con mutación germinal, que el 40% de las mutaciones no se hubiera identificado con criterios tradicionales de indicación de estudio genético4.

La importancia de identificar a individuos con CPH es el poder hacer prevención en sus familiares. Al diagnosticarse un síndrome hereditario se recomienda realizar el estudio genético presintomático a los familiares para identificar a los individuos con mayor riesgo de CP al ser portadores de la mutación germinal y, por tanto, ofrecer medidas preventivas que cambien la historia natural de esta mortal patología. Sin embargo, las recomendaciones actuales están realizadas por consenso y no existe evidencia científica sólida que las respalde, y mucho menos en nuestro medio.

3. Prevención y cribado de Cáncer de Páncreas.

Los individuos con historia familiar de CP o CPH se consideran de alto riesgo para desarrollo del CP, y por tanto, es aconsejable incluirlos en programas multidisciplinarios de cribado⁵⁻⁷. Canto y colaboradores observaron en un estudio de seguimiento a largo plazo de 354 individuos con alto riesgo de CP que 9 de 10 CP diagnosticados durante el cribado eran resecables y el 85% de estos sobrevivieron durante tres o más años^{8,9}. Actualmente, los programas de cribado en individuos de alto riesgo se basan en técnicas de imagen, como la ecoendoscopia y la resonancia magnética, que han demostrado aumentar la tasa de detección de lesiones premalignas y tumores en estadios tempranos^{8,10}. Sin embargo, estas modalidades presentan limitaciones significativas: a) baja sensibilidad para detectar lesiones subcentimétricas o de rápido crecimiento; b) elevada tasa de falsos positivos, que pueden llevar a intervenciones invasivas innecesarias; c) accesibilidad limitada y alto coste, lo que restringe su aplicación a gran escala.

Dada la incidencia creciente, la alta mortalidad del CP supeditada sobre todo al diagnóstico tardío y la eficacia subóptima del cribado¹¹⁻¹³, existe necesidad imperiosa de desarrollar estrategias novedosas y robustas para la detección de lesiones precursoras y CP en etapa temprana, como los biomarcadores no invasivos. Los individuos con alto riesgo de CP representan el subgrupo que se vería más beneficiado del empleo de biomarcadores para el cribado de CP. Un biomarcador ideal debería ser no invasivo, rentable, con alta sensibilidad y especificidad para detectar tumores tempranos o lesiones precursoras. En esta línea, el grupo de trabajo de este proyecto ha desarrollado un panel de micro-ARN (miARN) circulantes alterados que impresionan prometedores para la detección precoz no invasiva de CP y lesiones precursoras. Así, se ha definido una firma que consiste en 2 miARN (miR-33a-3p+miR-320a) + CA19.9 con los valores de diagnóstico más altos informados hasta la fecha (93% de sensibilidad y 85% de especificidad)¹⁴. Se necesitan más estudios para evaluar su posible utilidad diagnóstica, especialmente en individuos de alto riesgo de CP sometidos a detección y vigilancia. Asimismo, existen otros candidatos prometedores como son biomarcadores proteicos –como el THBS2–, marcadores de metilación, ctDNA, o exosomas atractivos para mejorar el cribado, especialmente si se superan limitaciones individuales de cada marcador¹⁵. En este sentido, se han desarrollado modelos de predicción de riesgo como PancPRO, sin embargo, ninguno ha logrado una alta rentabilidad y aplicabilidad en la práctica clínica^{15,16}. Por tanto, la integración de modelos de predicción de riesgo mediante algoritmos de inteligencia artificial, que combinen datos clínicos, genéticos, moleculares e imagenológicos, es otra estrategia innovadora, permitiendo focalizar el cribado en individuos con mayor probabilidad de desarrollar esta neoplasia y su diagnóstico precoz.

La red colaborativa **PREVENPANC** ya está establecida y está en marcha desde hace unos meses, con constante incremento de nuevos centros participantes desde que se ha puesto en marcha, demostrando ser una plataforma prometedora para el estudio colaborativo del cáncer de páncreas en España. Este registro prospectivo multicéntrico, que incluye la recolección sistemática de datos clínicos y muestras biológicas (sangre, tejido y ADN), permitirá caracterizar los grupos de riesgo (tanto en cáncer de páncreas hereditario como familiar) y sentar las bases para estudios traslacionales y clínicos. La existencia de PREVENPANC no solo garantiza una infraestructura consolidada y el acceso a una cohorte bien definida, sino que también facilita la integración de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos, siendo un recurso imprescindible para avanzar en la detección precoz del cáncer de páncreas.

Bibliografía más relevante

1. Ohmoto A, Yachida S, Morizane C. Molecular Sciences Genomic Features and Clinical Management of Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. DOI:10.3390/ijms20030561.
2. Hu C, Hart SN, Polley EC, Gnanaolivu R, Shimelis H, Lee KY et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA* 2018; 319: 2401. DOI: 10.1001/jama.2018.6228.
3. Young EL, Thompson BA, Neklason DW, Firpo MA, Werner T, Bell R et al. Pancreatic cancer as a sentinel for hereditary cancer predisposition. *BMC Cancer* 2018; 18: 697. DOI: 10.1186/s12885-018-4573-5
4. Llach J, Luzko I, Earl J, Barreto E, Rodríguez-Garrote M, Lleixà M..., Moreira L. Should We Offer Universal Germline Genetic Testing to All Patients with Pancreatic Cancer? A Multicenter Study. *Cancers* 2024; 16: 3779. DOI: 10.3390/cancers16223779
5. Llach J, Carballal S, Moreira L. Familial Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancer Manag Res* 2020; Volume 12: 743–758 DOI: 10.2147/CMAR.S172421
6. Llach J, Aguilera P, Sánchez A, Ginès A, Fernández-Esparrach G, Soy G,... Moreira L. Pancreatic Cancer Surveillance in Carriers of a Germline Pathogenic Variant in CDKN2A. *Cancers* 2023; 15: 1690. DOI: 10.3390/cancers15061690
7. Llach J, Moreno L, Sánchez A, Herrera-Pariente C, Ocaña T, Cuatrecasas M,... Moreira L. Genetic Counseling for Hereditary Gastric and Pancreatic Cancer in High-Risk Gastrointestinal Cancer Clinics: An Effective Strategy. *Cancers* 2020; 12: 2386. DOI: 10.3390/cancers12092386
8. Canto MI, Almario JA, Schulick RD, Yeo CJ, Klein A, Blackford A et al. Risk of Neoplastic Progression in Individuals at High Risk for Pancreatic Cancer Undergoing Long-term Surveillance. *Gastroenterology* 2018; 155: 740-751.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.05.035
9. Signoretti M, Bruno MJ, Zerboni G, Poley J-W, Delle Fave G, Capurso G. Results of surveillance in individuals at high-risk of pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *United Eur Gastroenterol J* 2018; 6: 489–499. DOI: 10.1177/2050640617752182
10. Vasen H, Ibrahim I, Ponce CG, Slater EP, Matthäi E, Carrato A et al. Benefit of Surveillance for Pancreatic Cancer in High-Risk Individuals: Outcome of Long-Term Prospective Follow-Up Studies From Three European Expert Centers. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2010–2019. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.0730
11. Overbeek KA, Levink IJM, Koopmann BDM, Harinck F, Konings ICAW, Ausems MGEM et al. Long-term yield of pancreatic cancer surveillance in high-risk individuals. *Gut* 2022; 71: 1152–1160. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323611

12. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. Gut 2020; 69: 7–17. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319352
13. Yu J, Blackford AL, dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. Gut 2015; 64: 1783–1789. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-309066
14. Vila-Navarro E, Duran-Sanchon S, Vila-Casadesús M, Moreira L, Ginès À, Cuatrecasas M, ... Gironella M. Novel Circulating miRNA Signatures for Early Detection of Pancreatic Neoplasia. Clin Transl Gastroenterol 2019; 10: e00029. DOI: 10.14309/ctg.0000000000000029
15. Kim J, Bamlet WR, Oberg AL, Chaffee KG, Donahue G, Cao X-J et al. Detection of early pancreatic ductal adenocarcinoma with thrombospondin-2 and CA19-9 blood markers. Sci Transl Med 2017; 9: eaah5583. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah5583

Hipótesis de trabajo y objetivos

La identificación de individuos con mayor riesgo de CP permitirá adoptar medidas dirigidas a reducir la mortalidad en este grupo mediante la detección precoz del CP y/o la reducción de su incidencia. Considerando que en un gran porcentaje de individuos con sospecha de CPH no se identifica ninguna mutación germinal, el **estudio de potenciales nuevos genes de mayor riesgo para el CP** representa un trabajo complementario perfecto para la identificación de individuos con mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia. La estratificación del riesgo en distintos subgrupos permitirá avanzar hacia el desarrollo e instauración de **medidas de prevención y seguimiento** más específicos, selectivos y **ajustados al riesgo intrínseco** de cada individuo.

La identificación de **biomarcadores no invasivos de riesgo y detección temprana de CP** en individuos de alto riesgo sería un complemento ideal para optimizar la vigilancia de estos pacientes. La propuesta consiste en desarrollar y validar una estrategia de cribado integral que combine la evaluación de biomarcadores circulantes (miRNAs, CA 19-9, THBS2, ctDNA, metilación, exosomas), el uso de técnicas de imagen y el desarrollo de un modelo de predicción de riesgo mediante inteligencia artificial. Este enfoque permitirá una detección temprana del CP en fases preclínicas, optimizando la asignación de recursos sanitarios y reduciendo intervenciones invasivas innecesarias. Esto debería repercutir en última instancia en la **racionalización de las estrategias de cribado y prevención** del CP en nuestro medio.

Finalmente, el consolidar un registro clínico y de muestras biológicas con una participación multicéntrica y prospectiva (**PREVENPANC**), establecerá las bases para crear un grupo de trabajo **sinérgico y la infraestructura para futuros proyectos** clínicos y traslacionales a corto plazo. Todo esto con el objetivo final de establecer herramientas de prevención, diagnóstico, terapéuticas y de pronóstico del CP en nuestro medio.

Objetivos

1. Identificar familias de alto riesgo de CP mediante secuenciación del exoma germinal en individuos con CP (cohorte prospectiva poblacional), y explorar nuevos genes de predisposición con estudios funcionales en organoides-3D.
2. Evaluar estrategias de cribado de CP en individuos de alto riesgo en seguimiento (cohorte retrospectiva) con pruebas de imagen y biomarcadores no invasivos.
3. Desarrollar un modelo predictivo de riesgo basado en inteligencia artificial.
4. Consolidar la red colaborativa PREVENPANC como plataforma nacional para la prevención del CP.

El objetivo global del proyecto es **profundizar en el conocimiento del CP**, integrando enfoques clínicos y moleculares para **identificar individuos de alto riesgo de CP, a fin de establecer las mejores estrategias de prevención y diagnóstico precoz**; y consolidar **una red nacional para estudio del CP (“PREVENPANC”)** de cara a fomentar proyectos de investigación colaborativos. Este objetivo global se llevará a cabo a través de dos cohortes interrelacionados, cada uno con un protocolo clínico y otro traslacional (Anexo 2).

1. [Cohorte poblacional: Identificación de grupos de riesgo de CP \(Riesgo familiar/hereditario\).](#)

a) Protocolo clínico:

1. Identificar los factores y grupos de riesgo asociados a CP en global y establecer la prevalencia de mutaciones genéticas germinales en los individuos con CP (CPH).
2. Establecer la **estrategia más eficaz** para identificar individuos con **predisposición hereditaria a CP**

b) Protocolo traslacional:

1. **Descubrir y validar nuevos genes hereditarios asociados a un mayor riesgo de CP** (en base a datos previos del grupo de trabajo) mediante secuenciación del exoma germinal.
2. **Evaluar la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas a través de estudios funcionales in vitro** mediante la generación y modificación de organoides 3D pancreáticos.

2. Corte de individuos de alto riesgo de CP: Estrategias de cribado de CP en grupo de alto riesgo de esta neoplasia (riesgofamiliar/hereditario).

a) **Protocolo clínico:**

1. Identificar **factores de riesgo y prevalencia** de CP en familias CPF y CPH.
2. Evaluar la **eficacia de las estrategias de cribado** actuales en CPF y CPH.

b) **Protocolo traslacional:**

Identificación de biomarcadores para cribado y diagnóstico precoz de CP en grupos de alto riesgo para esta neoplasia (CPF y CPH).

1. Identificar y validar un panel de biomarcadores no invasivos (miRNAs, CA 19-9, THBS2, ctDNA, patrones de metilación, exosomas).
2. Desarrollar y validar un modelo de predicción de riesgo que integre datos clínicos, genéticos, moleculares e imagenológicos.

Finalmente, el objetivo secundario es consolidar una red multicéntrica nacional para el estudio colaborativo en la prevención de CP en nuestro medio (**“PREVENPANC”**):

1. Establecer la infraestructura idónea por medio de **recolección prospectiva de muestras** biológicas **para estudios traslacionales enfocados en CP**, de cara a establecer herramientas de prevención y diagnóstico del CP en nuestro medio.
2. **Crear una cohorte** con información clínica y muestras biológicas de individuos sin patología pancreática como grupo control para futuros proyectos en el seno de la red PREVENPANC.
3. **Fomentar la investigación** clínica y traslacional en CP, dando oportunidad a centros de toda España de participar en la inclusión de pacientes y en propuestas de estudios en contexto de la red colaborativa.

Material y métodos detallados:

Diseño del estudio: Estudio multicéntrico nacional (24 centros de 12 Comunidades Autónomas), con una rama prospectiva de base poblacional, y una rama retrospectiva. El centro responsable del estudio será el Hospital Clínic de Barcelona. El Anexo 2 representa un resumen gráfico del diseño y el Anexo 3 el listado de centros participantes.

Pacientes

1. Cohorte poblacional:

Inclusión prospectiva de pacientes diagnosticados de CP durante 12 meses en los centros participantes, asociados a un grupo control de individuos sin patología pancreática conocida, emparejados por edad y sexo.

- a)** Pacientes con CP (grupo a estudio, CP): Se registrará la historia clínica personal y familiar y las características tumorales. Se obtendrá una muestra de sangre periférica de cada paciente incluido (para estudio del suero, plasma y ADN).
- b)** Individuos sin patología pancreática (grupo control): Por cada paciente con CP se incluirá un individuo control de edad y sexo. Esta cohorte estará formada por individuos sin cáncer conocido, patología pancreática ni antecedentes familiares de CP, que acudan a consulta de gastroenterología general, con una prueba de imagen abdominal (RMN o TAC) sin patología pancreática (i.e. neoplasia, pancreatitis crónica, lesiones premalignas). Se registrará la historia clínica personal y familiar; y se obtendrá una muestra de sangre periférica (suero, plasma y ADN).

2. Cohorte de individuos de individuos con alto riesgo de CP:

Estudio multicéntrico con inclusión retrospectiva de individuos pertenecientes a familias con CP familiar o CPH en seguimiento desde el 2014 hasta la actualidad en las unidades de alto riesgo (CAR) de cáncer digestivo de los centros participantes. Actualmente se cuenta en biobanco con muestras de sangre periférica de la mayoría de estos individuos (suero, plasma y ADN).

Estimación del tamaño de la muestra:

En base a la población de influencia de los 24 centros participantes (aproximadamente 16.757.000 habitantes) y la incidencia anual del CP en España (6,3 casos x 100.000 habitantes), se estima una población diana en un periodo de 12 meses de aproximadamente 1055 pacientes con CP. Considerando una inclusión realista del 60% de los casos, el tamaño muestral sería de 633 pacientes con CP y 633 individuos control. Para la cohorte de individuos de la consulta de alto riesgo, se realizará inclusión de los individuos pertenecientes a familias con alto riesgo de CP que acepten participar del estudio (se estima en base a número de individuos en seguimiento, una cohorte de 250-300 individuos).

Recogida de datos:

Los datos se recogerán en una base de datos de uso online (REDCap-AEG) a la que podrán acceder los investigadores de cada centro mediante un código identificativo, respetando la vigente Ley Orgánica de Protección de Datos. En cada centro se introducirá la información de los pacientes en la base de datos encriptada. cohorte de 250-300 individuos).

Recolección y conservación de muestras biológicas (sangre):

Se obtendrá una muestra de sangre periférica a través de 3 tubos (total 25ml) para plasma, suero y ADN. En caso de paciente con CP, la extracción deberá realizarse antes de iniciar cualquier tratamiento específico (cirugía, quimioterapia y/o radioterapia). Todas las muestras serán enviadas, procesadas y almacenadas en el [Biobanco del Hospital Clínic de Barcelona - IDIBAPS.](#)

Por lo tanto, la metodología de este proyecto se centra en **tres pilares fundamentales: a) Identificación de grupos de riesgo de CP (riesgo personal/familiar o hereditario); b) estrategias de cribado de CP en grupos de alto riesgo de esta neoplasia; y c) la consolidación de PREVENPANC** como una red sólida, multicéntrica nacional para el estudio colaborativo del CP (Anexo 2).

A continuación, se describe el protocolo clínico y el protocolo traslacional de cada uno de las dos cohortes

Métodos:

1. Cohorte poblacional: Pacientes diagnosticados de CP durante 12 meses en los centros participantes, asociados a un grupo control sin patología pancreática conocida, apareados por edad y género.

Protocolo clínico: Identificación de factores y grupos de riesgo asociados a CP 1.1.1.

Se recogerán los datos en una base de datos online (REDCap-AEG):

- a)** Datos sociodemográficos, comorbilidades, antecedentes familiares y personales oncológicos.
- b)** Tumor: edad al diagnóstico, síntomas y parámetros analíticos de debut, localización pancreática del tumor, presencia de lesiones previas, histología, tratamientos, estadiaje TNM, supervivencia, causa de muerte.

1.1.2. Se realizará estudio genético en todos los pacientes con CP a través de secuenciación del exoma germinal.

* Análisis de los resultados: Se establecerá la prevalencia de mutaciones en los genes implicados en síndromes hereditarios en pacientes con CP y se relacionará el resultado con las características clínicas.

1.2. Protocolo traslacional: Identificación de nuevos genes de predisposición hereditaria al CP.

1.2.1. Tras secuenciar las muestras (exoma germinal), se seleccionarán genes candidatos en línea germinal y se evaluará la patogenicidad de las variantes mediante estudios in vitro con organoides 3D pancreáticos generados partir de tejido fresco de muestras quirúrgicas de tres pacientes sin CP, de acuerdo al protocolo del laboratorio Clevers.

1.2.2. Modificación genética de organoides 3D mediante la técnica CRISPR-Cas9 delecionando de forma dirigida el gen correspondiente e introduciendo la variante de interés por transfección. Se analizará funcionalidad de las variantes a estudio mediante ensayos de viabilidad, proliferación y señalización.

2 Cohorte de individuos de alto riesgo de CP (pertenecientes a familias con CP hereditario o familiar en seguimiento)

2.1. Protocolo clínico: Caracterización clínica y eficacia del cribado de CP en grupos de alto riesgo de CP

2.1.1. Descripción de estrategias de cribado de CP en los distintos centros (prueba utilizada y sus hallazgos, periodicidad y edad de inicio del cribado).

2.1.2. Caracterización de lesiones sospechosas de CP por USE y/o RMN: tipo de lesión, crecimiento de quistes >4mm/año, localización, tamaño, resecabilidad, atrofia parénquima lobulocéntrica, dilatación del Wirsung). Se definirán como sospechosas las lesiones sólidas, TPMI, quísticas ≥ 10 mm, quísticas con nódulo mural.

2.1.3. Determinación de CA 19.9 y hemoglobina glicada en sangre.

2.2. Protocolo traslacional: Identificación de biomarcadores / modelo predictivo para el cribado de CP en grupos de alto riesgo para esta neoplasia (CP hereditario/familiar).

2.2.1. Análisis de expresión de **miARNs** en sangre mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los miARNs a analizar se han elegido en base a datos preliminares de nuestro grupo.

2.2.2. Proteínas séricas: CA 19-9 y THBS2 (medidos por ELISA).

2.2.3. ctDNA y patrones de metilación: Detección de mutaciones en KRAS y análisis de metilación de genes supresores (usando PCR digital y secuenciación con array de metilación de Illumina EPICv2, respectivamente).

2.2.4. Exosomas: Aislamiento y cuantificación de GPC1 con citometría de flujo.

2.2.5. Creación de un modelo predictivo/score de riesgo de biomarcadores no invasivos para la detección precoz CP y lesiones precursoras. **Integración Multimodal:** Combinación de biomarcadores moleculares (incluyendo miRNAs, ctDNA, metilación, exosomas) y técnicas de imagen. **Modelo Predictivo Personalizado:** Desarrollo de un score de riesgo mediante inteligencia artificial que integre datos clínicos, genéticos, moleculares e imagenológicos.

* Desarrollo y entrenamiento de modelos predictivos mediante técnicas de machine learning (Random Forest, XGBoost, redes neuronales).

* Análisis estadístico. Las diferencias entre variables cualitativas se compararán mediante prueba de Fisher y las cuantitativas con Mann-Whitney o Kruskall-Wallis para muestras no pareadas y Wilcoxon para las pareadas. Un valor "p" < 0.05 se considerará estadísticamente significativo.

Perspectiva de género. Se garantizará el respeto y equidad en cuanto a identidad de género a lo largo del estudio. Desde la ideación del proyecto en cuanto a oportunidades de participación a investigadores colaboradores sin distinción de género. En cuanto a los participantes del estudio, respetando género autodesignado, el análisis de factores de riesgo específicos o influencias de tratamiento individuales en la aparición de la patología en estudio, identificar si existen disparidades en cuanto a detección más precoz y acceso a tratamiento según género y características socio-demográficas de los pacientes. Se respetará la identidad de género en la divulgación de resultados, sean estos positivos o negativos.

